



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer : **0 679 657 A2**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer : **95810259.2**

(51) Int. Cl.⁶ : **C07H 19/067**, C07H 19/167,
C07H 21/00, C12Q 1/68,
A61K 31/70

(22) Anmeldetag : **19.04.95**

(30) Priorität : **27.04.94 CH 1307/94**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung :
02.11.95 Patentblatt 95/44

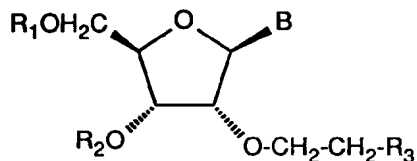
(84) Benannte Vertragsstaaten :
**AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI LU NL PT
SE**

(71) Anmelder : **CIBA-GEIGY AG**
Klybeckstrasse 141
CH-4002 Basel (CH)

(72) Erfinder : **Martin, Pierre, Dr.**
Meisenweg 38
CH-4310 Rheinfelden (CH)

(54) **Nukleoside und Oligonukleotide mit 2'-Ethergruppen.**

(57) Es werden Verbindungen der Formel



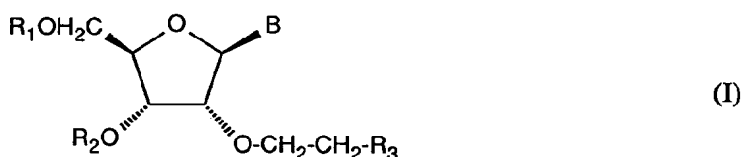
beschrieben, worin R_1 und R_2 unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder R_1 diese Bedeutungen hat und R_2 für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht ; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet ; und R_3 für OH, F oder $(CF_2)_nCF_3$ steht, worin n eine Zahl von 0 bis 7 bedeutet, und Oligonukleotide, die diese Nukleoside enthalten.

EP 0 679 657 A2

Die Erfindung betrifft Ribo-Nukleosidanaloge, deren 2'-OH Gruppe mit Hydroxyethyl- oder Fluoralkylgruppen verethert ist, ein Verfahren zu deren Herstellung, Oligonukleotide mit diesen Nukleosiden und die Verwendung der Nukleoside zur Herstellung von Oligonukleotiden mit gleichen oder verschiedenen Nukleosideinheiten im Molekül.

Nukleoside und Oligonukleotide haben als antivirale Wirkstoffe bzw. wegen ihrer Fähigkeit zur Wechselwirkung mit Nukleinsäuren ("Antisense"-Oligonukleotide) und der damit verbundenen biologischen Aktivität breites Interesse gefunden, siehe zum Beispiel Uhlmann, E., Peyman, A., Chemical Reviews 90:543-584 (1990). Zur Bereitstellung von Nukleosiden mit neuen Eigenschaften oder zur Verbesserung der Wechselwirkung von Antisense-Oligonukleotiden mit natürlichen Nukleinsäuren sowie ihrer Stabilität gegenüber Nukleasen sind die Zuckerreste von Nukleosiden (bzw. der Nukleotideinheiten in Oligonukleotiden), oder die internukleotidische Phosphatbindung in Oligonukleotiden in unterschiedlichster Weise modifiziert worden, siehe zum Beispiel Marquez, V.E., Lim, M.I., Medicinal Research Reviews 6:1-40 (1986), Hélène, C., Toulmé, J.J., Biochimica et Biophysica Acta 1049:99-125 (1990), Englisch, U., Gauss, D.H., Angewandte Chemie 103:629-646 (1991), Matteucci, M.D., Bischofberger, N., Annual Reports in Medicinal Chemistry 26:87-296 (1991). In Cook, P.D., Anti-Cancer Drug Design 6:585-607 (1991) und WO 91/06556 werden Nukleoside beschrieben, die an der 2'-OH-Gruppe des Zuckers modifiziert sind. Die beschriebenen Modifikationen führen zu erhöhter Nukleaseresistenz; je länger der Alkylrest wird, umso höher wird die Nukleaseresistenz. Dabei wird mit kleinen Alkylresten wie Methyl, Ethyl oder Propyl eine schwache Erhöhung der Bindungsaffinität beobachtet, bei längeren Ketten sinkt die Bindungsaffinität aber drastisch ab. Nukleoside mit Hydroxyethyl- oder Fluoralkylgruppen als Seitenketten an der 2'-OH Gruppe wurden bis anhin nie in Oligonukleotide eingebaut. Überraschenderweise erhöhen die erfindungsgemässen Modifikationen die Bindungsaffinität zur komplementären RNA gegenüber gleich langen unsubstituierten Alkylketten. Dieses Ergebnis war aufgrund der publizierten Daten nicht zu erwarten. In Analogie zu den 2'-OH-modifizierten Oligoribonukleotiden zeichnen sich die erfindungsgemässen Verbindungen ebenfalls durch eine markante Nukleaseresistenz aus. Zusätzlich weisen Oligonukleotide, welche die erfindungsgemässen Nukleoside enthalten, eine erhöhte zelluläre Aufnahme auf und verfügen demzufolge über eine verbesserte Bio-Verfügbarkeit und Aktivität in vivo.

Ein Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der Formel I



worin R_1 und R_2 unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder R_1 diese Bedeutungen hat und R_2 für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und R_3 für OH, F oder $(CF_2)_nCF_3$ steht, worin n eine Zahl von 0 bis 7 bedeutet.

Wenn R_3 OH bedeutet, kann diese Hydroxygruppe mit einer Gruppe wie für R_1 und R_2 definiert geschützt sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform steht n für die Zahl 0.

In einer bevorzugten Ausführungsform stellen R_1 und R_2 Wasserstoff dar.

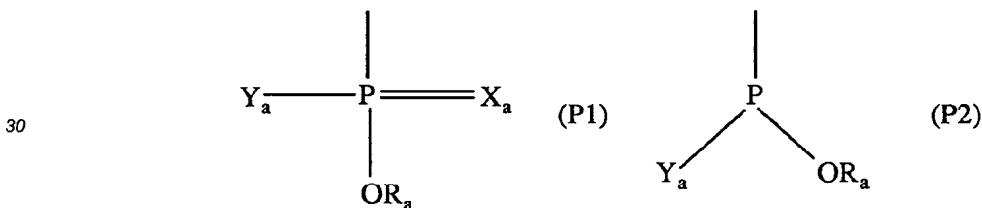
Schutzgruppen und Verfahren zur Derivatisierung der Hydroxylgruppen mit solchen Schutzgruppen sind in der Zucker- und Nukleotidchemie allgemein bekannt und zum Beispiel von Greene, B.T., Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley Interscience, New York (1991), von Sonveaux, E., Bioorganic Chemistry 14:274-325 (1986) oder von Beaucage, S.L., Iyer, R., Tetrahedron 48:2223-2311 (1992) beschrieben. Beispiele für solche Schutzgruppen sind: Benzyl, Methylbenzyl, Dimethylbenzyl, Methoxybenzyl, Dimethoxybenzyl, Brombenzyl, 2,4-Dichlorbenzyl; Diphenylmethyl, Di(methylphenyl)methyl, Di(dimethylphenyl)methyl, Di(methoxyphenyl)methyl, Di(dimethoxyphenyl)methyl, Triphenylmethyl, Tris-4,4',4''-tert.butylphenylmethyl, Di-p-anisylphenylmethyl, Tri(methylphenyl)methyl, Tri(dimethylphenyl)methyl, Methoxyphenyl(diphenyl)methyl, Di(methoxyphenyl)phenylmethyl, Tri(methoxyphenyl)methyl, Tri(dimethoxyphenyl)methyl; Triphenylsilyl, Alkyldiphenylsilyl, Dialkylphenylsilyl und Trialkylsilyl mit 1 bis 20, bevorzugt 1 bis 12 und besonders bevorzugt 1 bis 8 C-Atomen in den Alkylgruppen, zum Beispiel Trimethylsilyl, Triethylsilyl, Tri-n-propylsilyl, i-Propyl-dimethylsilyl, t-Butyl-dimethylsilyl, t-Butyl-diphenylsilyl, n-Octyl-dimethylsilyl, (1,1,2,2-Tetramethylethyl)-dimethylsilyl; $-(C_1-C_8-Alkyl)_2Si-O-Si(C_1-C_8-Alkyl)_2-$, worin Alkyl zum Beispiel Methyl, Ethyl n- und i-Propyl, n-, i- oder t-Butyl bedeutet; $C_2-C_{12}-$, besonders C_2-C_8 -Acyl, wie zum Beispiel Acetyl, Propanoyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, Benzoyl, Methylbenzoyl, Methoxybenzoyl, Chlorbenzoyl und Brombenzoyl; $R_{S1}-SO_2-$, worin R_{S1} C_1-C_{12} -Alkyl, besonders

C₁-C₆-Alkyl, C₅- oder C₆-Cycloalkyl, Phenyl, Benzyl, C₁-C₁₂- und besonders C₁-C₄-Alkylphenyl, oder C₁-C₁₂- und besonders C₁-C₄-Alkylbenzyl, oder Halogenphenyl oder Halogenbenzyl bedeutet, zum Beispiel Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Phenyl-, Benzyl-, p-Brom-, p-Methoxy- und p-Methylphenylsulfonyl; unsubstituiertes oder mit F, Cl, Br, C₁-C₄-Alkoxy, Tri-(C₁-C₄-Alkyl)silyl oder C₁-C₄-Alkylsulfonyl substituiertes C₁-C₁₂-, bevorzugt C₁-C₈-Alkoxy-carbonyl, zum Beispiel Methoxy-, Ethoxy-, n- oder i-Propoxy- oder n-, i- oder t-Butoxycarbonyl, 2-Trimethylsilylethoxycarbonyl, 2-Methylsulfonylethoxycarbonyl, Allyloxycarbonyl oder unsubstituiertes oder wie für Alkoxy-carbonyl substituiertes Phenyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl, zum Beispiel Methyl- oder Methoxy- oder Chlorphenyloxycarbonyl oder -benzyloxycarbonyl, sowie 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl. Sofern R₁ und/oder R₂ Alkyl bedeuten, kann es mit F, Cl, Br, C₁-C₄-Alkoxy, Phenyloxy, Chlorphenyloxy, Methoxyphenyloxy, Benzyloxy, Methoxybenzyloxy oder Chlorphenyloxy substituiert sein. Bei R₁ und R₂ in Formel I kann es sich um gleiche oder verschiedene Schutzgruppen handeln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform stellen R₁ und R₂ als Schutzgruppen Benzyl, Methylbenzyl, Dimethylbenzyl, Methoxybenzyl, Dimethoxybenzyl, halogeniertes Benzyl, insbesondere Brombenzyl; Diphenylmethyl, Di(methylphenyl)methyl, Di(dimethylphenyl)methyl, Di(methoxyphenyl)methyl, Di(methoxyphenyl)(phenyl)methyl, Triphenylmethyl, Tris-4,4',4''-tert.butylphenylmethyl, Di-p-anisylphenylmethyl, Tri(methylphenyl)methyl, Tri(dimethylphenyl)methyl, Tri(methoxyphenyl)methyl, Tri(dimethoxyphenyl)methyl; Trimethylsilyl, Triethylsilyl, Tri-n-propylsilyl, i-Propyl-dimethylsilyl, t-Butyl-dimethylsilyl, t-Butyl-diphenylsilyl, n-Octyl-dimethylsilyl, (1,1,2,2-Tetramethylethyl)-dimethylsilyl, -(CH₃)₂Si-O-Si(CH₃)₂-, -(i-C₃H₇)₂Si-O-Si(i-C₃H₇)₂-, Acetyl, Propanoyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, Benzoyl, Methylbenzoyl, Methoxybenzoyl, Chlorbenzoyl und Brombenzoyl; Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Phenyl-, Benzyl-, p-Brom-, p-Methoxy- und p-Methylphenylsulfonyl; Methoxy-, Ethoxy-, n- oder i-Propoxy- oder n-, i- oder t-Butoxycarbonyl, oder Phenyloxycarbonyl, Benzyloxycarbonyl, Methyl- oder Methoxy- oder Chlorphenyloxycarbonyl oder -benzyloxycarbonyl oder 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl dar.

R₂ kann als phosphorhaltiger eine Nukleotid-Brückengruppe bildender Rest der Formel P1 oder P2

25



entsprechen, worin Y_a Wasserstoff, C₁-C₁₂-Alkyl, C₆-C₁₂-Aryl, C₇-C₂₀-Aralkyl, C₇-C₂₀-Alkaryl, -OR_b, -SR_b, -NH₂, Primäramino, Sekundäramino, O[⊖]M[⊕] oder S[⊖]M[⊕] darstellt; X_a Sauerstoff oder Schwefel bedeutet; R_a Wasserstoff, M[⊕], C₁-C₁₂-Alkyl, C₂-C₁₂-Alkenyl, C₆-C₁₂-Aryl, oder die Gruppe R_aO- für N-Heteroaryl-N-yl mit 5 Ringgliedern und 1 bis 3 N-Atomen steht; R_b Wasserstoff, C₁-C₁₂-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl bedeutet; und M[⊕] für Na[⊕], K[⊕], Li[⊕], NH₄[⊕] steht oder Primär-, Sekundär-, Tertiär- oder Quartenärammonium darstellt; wobei Alkyl, Aryl, Aralkyl und Alkaryl in Y_a, R_a und R_b unsubstituiert oder mit Alkoxy, Alkylthio, Halogen, -CN, -NO₂, Phenyl, Nitrophenyl, oder Halogenphenyl substituiert ist.

Y_a enthält als Primäramino bevorzugt 1 bis 12 und besonders bevorzugt 1 bis 6 C-Atome, und als Sekundäramino bevorzugt 2 bis 12 und besonders bevorzugt 2 bis 6 C-Atome.

Bei dem Primäramino und Sekundäramino kann es sich zum Beispiel um Reste der Formel R_cR_dN handeln, worin R_c für H steht oder unabhängig die Bedeutung von R_d hat, und R_d C₁-C₂₀-, bevorzugt C₁-C₁₂- und besonders bevorzugt C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₂₀-, bevorzugt C₁-C₁₂- und besonders bevorzugt C₁-C₆-Aminoalkyl, C₁-C₂₀-, bevorzugt C₁-C₁₂- und besonders bevorzugt C₁-C₆-Hydroxyalkyl; Carboxyalkyl oder Carbalkoxyalkyl, wobei die Carbalkoxygruppe 2 bis 8 C-Atome enthält und die Alkylgruppe 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 C-Atome; C₂-C₂₀-, bevorzugt C₂-C₁₂- und besonders bevorzugt C₂-C₆-Alkenyl; Phenyl, Mono- oder Di-(C₁-C₄-Alkyl- oder -Alkoxy)phenyl, Benzyl, Mono- oder Di-(C₁-C₄-Alkyl- oder -Alkoxy)benzyl; oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolyl-C₁-C₆-Alkyl darstellt, oder R_c und R_d zusammen Tetra- oder Pentamethylen, 3-Oxa-1,5-pentyl, -CH₂-NR_e-CH₂CH₂- oder -CH₂CH₂-NR_e-CH₂CH₂- darstellen, worin R_e für H oder C₁-C₄-Alkyl steht. Die Aminogruppe im Aminoalkyl kann mit ein oder zwei C₁-C₄-Alkyl oder -Hydroxyalkylgruppen substituiert sein. Die Hydroxylgruppe im Hydroxyalkyl kann mit C₁-C₄-Alkyl verethert sein.

Unter Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärammonium ist für Y_a im Zusammenhang mit der Definition von M[⊕] ein Ion der Formel R_fR_gR_hR_iN[⊕] zu verstehen, bei dem R_f C₁-C₂₀-, bevorzugt C₁-C₁₂- und besonders bevorzugt C₁-C₆-Alkyl, -Aminoalkyl, -Hydroxyalkyl; Carboxyalkyl oder Carbalkoxyalkyl, wobei die Carbalkoxygruppe 2 bis 8 C-Atome enthält und die Alkylgruppe 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 C-Atome; C₂-C₂₀-,

bevorzugt C₂-C₁₂- und besonders bevorzugt C₂-C₆-Alkenyl; Phenyl, Mono- oder Di-(C₁-C₄-Alkyl- oder -Alkoxy)phenyl, Benzyl, Mono- oder Di-(C₁-C₄-Alkyl- oder -Alkoxy)benzyl; oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolyl-C₁-C₆-Alkyl darstellt, und R_g, R_h und R_i unabhängig voneinander Wasserstoff sind oder die Bedeutung von R_f haben, oder R_f und R_g zusammen Tetra- oder Pentamethylen, 3-Oxa-1,5-pentyl, -CH₂-NR_e-CH₂CH₂- oder -CH₂CH₂-NR_e-CH₂CH₂- darstellen, worin R_e für H oder C₁-C₄-Alkyl steht, und R_h und R_i unabhängig voneinander die Bedeutung von R_f haben. Die Aminogruppe im Aminoalkyl kann mit ein oder zwei C₁-C₄-Alkyl oder -Hydroxyalkylgruppen substituiert sein. Die Hydroxylgruppe im Hydroxyalkyl kann mit C₁-C₄-Alkyl verethert sein.

Beispiele für Carboxyalkyl sind Carboxymethyl, Carboxyethyl, Carboxypropyl und Carboxybutyl, und Beispiele für Carbalkoxyalkyl sind diese mit Methyl oder Ethyl veresterten Carboxyalkylgruppen. Beispiele für Alkenyl sind Allyl, But-1-en-3-yl oder -4-yl, Pent-3- oder 4-en-1-yl oder -2-yl, Hex-3- oder 4- oder -5-en-1-yl oder -2-yl. Beispiele für Alkyl- und Alkoxyphenyl beziehungsweise -benzyl sind Methylphenyl, Dimethylphenyl, Ethylphenyl, Diethylphenyl, Methylbenzyl, Dimethylbenzyl, Ethylbenzyl, Diethylbenzyl, Methoxyphenyl, Dimethoxyphenyl, Ethoxyphenyl, Diethoxyphenyl, Methoxybenzyl, Dimethoxybenzyl, Ethoxybenzyl, Diethoxybenzyl. Beispiele für Imidazolylalkyl, in dem die Alkylgruppe bevorzugt 2 bis 4 C-Atome enthält, sind 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolylethyl oder -n-propyl oder -n-butyl. R₁₉ stellt bevorzugt H, Methyl oder Ethyl dar.

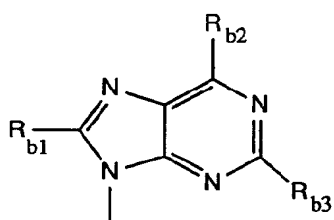
Bevorzugte Beispiele für Primäramino und Sekundäramino sind Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethyl-, Di-i-Propyl-, Mono- oder Di-(1-hydroxy-eth-2-yl)-, Phenyl- und Benzylamino, Acetylamino und Benzoylamino sowie Piperidinyl, Piperazinyl und Morpholinyl.

Bevorzugte Beispiele für Primär- und Sekundärammonium sind Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethyl-, Di-i-Propyl-, Mono- oder Di-(1-hydroxy-eth-2-yl)-, Phenyl- und Benzylammonium.

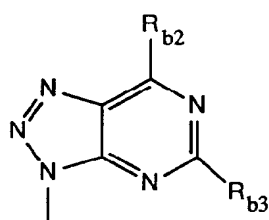
Beispiele für Y_a, R_a und R_b als Alkyl sind Methyl, Ethyl und die Isomeren von Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl und Octyl; Beispiele für Y_a, R_a und R_b als Aryl sind Phenyl und Naphthyl; Beispiele für R_a als Alkenyl sind Allyl und (C₁-C₄-Alkyl)CH=CH-CH₂-; Beispiele für Y_a als Aralkyl sind Phenyl-C_nH_{2n}- mit n gleich einer Zahl von 1 bis 6, besonders Benzyl; Beispiele für Y_a als Alkaryl sind Mono-, Di- und Tri(C₁-C₄-alkyl)phenyl. Bevorzugte Substituenten sind Chlor, Brom, Methoxy, -NO₂, -CN, 2,4-Dichlorphenyl und 4-Nitrophenyl. Beispiele für R_b sind 2,2,2-Trichlorethyl, 4-Chlorphenyl, 2-Chlorphenyl und 2,4-Dichlorphenyl; und Beispiele für R_bO- als N-Heteroaryl sind Pyrrol-N-yl, Triazol-N-yl und Benzotriazol-N-yl.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bedeutet R_a β-Cyanoethyl und stellt Y_a Di(i-propylamino) dar.

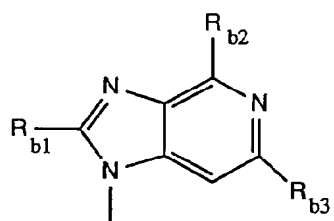
Wenn B einen Purinrest oder ein Analoges davon darstellt, so kann es sich um einen Rest der Formel II, IIa, IIb, IIc, IId, IIe oder IIf handeln,



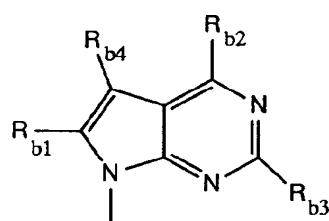
(II),



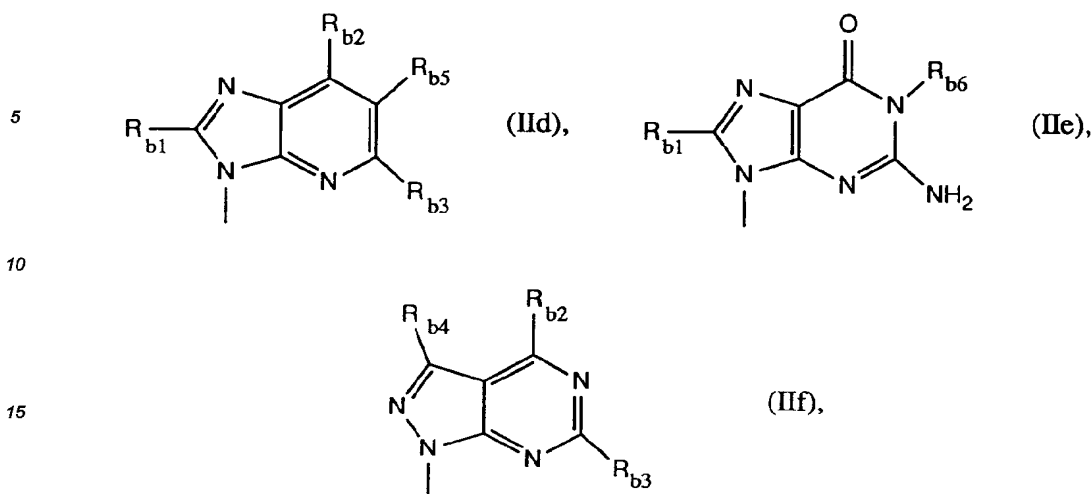
(IIa),



(IIb),



(IIc),



20 worin R_{b1} für H, Cl, Br, OH oder $-O-C_1-C_{12}$ -Alkyl steht, und R_{b2} , R_{b3} und R_{b5} unabhängig voneinander H, OH, SH, NH_2 , $NHNH_2$, $NHOH$, $NHO-C_1-C_{12}$ -Alkyl, $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$, $-N=CH$ -Azacycloalkyl, F, Cl, Br, C_1-C_{12} -Alkyl, Hydroxy- C_1-C_{12} -alkyl, Amino- C_1-C_{12} -alkyl, C_1-C_{12} -Alkoxy, Benzyloxy, C_1-C_{12} -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen oder Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen bedeuten, R_{b4} Wasserstoff, CN oder $-C\equiv C-R_{b7}$, R_{b6} und R_{b7} Wasserstoff oder C_1-C_4 -Alkyl darstellen.

Geeignete Schutzgruppen sind zuvor erwähnt worden. Bevorzugte Schutzgruppen sind C_1-C_8 -Acylgruppen, wie zum Beispiel Acetyl, Propionyl, Butyryl und Benzoyl. R_{b6} steht bevorzugt für H oder Methyl.

Das Primäramino enthält bevorzugt 1 bis 12 und besonders bevorzugt 1 bis 6 C-Atome, und das Sekundäramino bevorzugt 2 bis 12 und besonders bevorzugt 2 bis 6 C-Atome.

30 Einige Beispiele für Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxyalkyl und Aminoalkyl, die bevorzugt 1 bis 6 C-Atome enthalten, sind Methyl, Ethyl und die Isomeren von Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonyl, Decyl, Undecyl und Dodecyl, sowie entsprechende Alkoxy-, Alkylthio-, Hydroxyalkyl- und Aminoalkylreste. Das Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxyalkyl und Aminoalkyl enthält besonders bevorzugt 1 bis 4 C-Atome. Bevorzugte Alkyl-, Alkoxy-, Alkylthio-, Hydroxyalkyl- und Aminoalkylreste sind Methyl, Ethyl, n- und i-Propyl, n-, i- und t-Butyl, Methoxy, Ethoxy, Methylthio und Ethylthio, Aminomethyl, Aminoethyl, Hydroxymethyl und Hydroxyethyl.

Bei dem Primäramino und Sekundäramino kann es sich zum Beispiel um Reste der Formel $R_{a1}R_{a2}N$ handeln, worin R_{a1} für H steht oder unabhängig die Bedeutung von R_{a2} hat, und R_{a2} C_1-C_{20} -, bevorzugt C_1-C_{12} - und besonders bevorzugt C_1-C_6 -Alkyl, -Aminoalkyl, -Hydroxyalkyl; Carboxyalkyl oder Carbalkoxyalkyl, wobei die Carbalkoxygruppe 2 bis 8 C-Atome enthält und die Alkylgruppe 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 C-Atome; C_2-C_{20} -, bevorzugt C_2-C_{12} - und besonders bevorzugt C_2-C_6 -Alkenyl; Phenyl, Mono- oder Di- $(C_1-C_4$ -Alkyl- oder -Alkoxy)phenyl, Benzyl, Mono- oder Di- $(C_1-C_4$ -Alkyl- oder -Alkoxy)benzyl; oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolyl- C_1-C_6 -Alkyl darstellt, oder R_{a1} und R_{a2} zusammen Tetra- oder Pentamethylen, 3-Oxa-1,5-pentilen, $-CH_2-NR_{a3}-CH_2CH_2-$ oder $-CH_2CH_2-NR_{a3}-CH_2CH_2-$ darstellen, worin R_{a3} für H oder C_1-C_4 -Alkyl steht. Die Aminogruppe im Aminoalkyl kann mit ein oder zwei C_1-C_4 -Alkyl oder -Hydroxyalkylgruppen substituiert sein. Die Hydroxylgruppe im Hydroxyalkyl kann mit C_1-C_4 -Alkyl verethert sein.

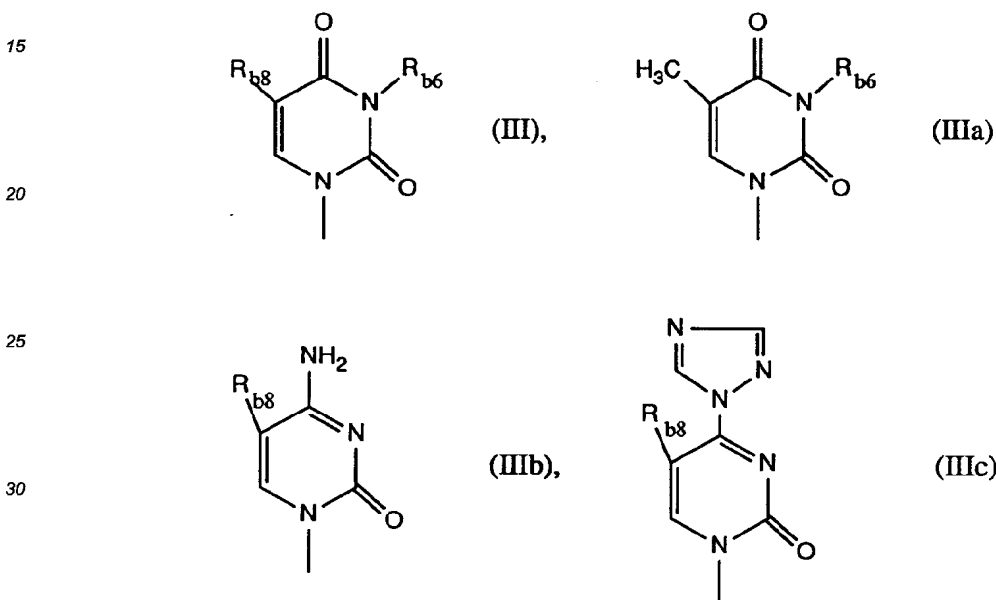
Beispiele für Alkyl sind zuvor angegeben worden. Beispiele für Aminoalkyl sind Aminomethyl, Aminoethyl, 1-Aminoprop-2-yl oder -3-yl, 1-Amino-but-2-yl oder -3-yl oder -4-yl, N-Methyl- oder N,N-Dimethyl- oder N-Ethyl- oder N,N-Diethyl- oder N-2-Hydroxyethyl- oder N,N-Di-2-hydroxyethylaminomethyl oder -aminoethyl oder -aminopropyl oder -aminobutyl. Beispiele für Hydroxyalkyl sind Hydroxymethyl, 1-Hydroxy-eth-2-yl, 1-Hydroxy-prop-2- oder -3-yl, 1-Hydroxy-but-2-yl, -3-yl oder -4-yl. Beispiele für Carboxyalkyl sind Carboxymethyl, Carboxyethyl, Carboxypropyl und Carboxybutyl, und Beispiele für Carbalkoxyalkyl sind diese mit Methyl oder Ethyl veresterten Carboxyalkylgruppen. Beispiele für Alkenyl sind Allyl, But-1-en-3-yl oder -4-yl, Pent-3- oder 4-en-1-yl oder -2-yl, Hex-3- oder -4- oder -5-en-1-yl oder -2-yl. Beispiele für Alkyl- und Alkoxyphenyl beziehungsweise -benzyl sind Methylphenyl, Dimethylphenyl, Ethylphenyl, Diethylphenyl, Methylbenzyl, Dimethylbenzyl, Ethylbenzyl, Diethylbenzyl, Methoxyphenyl, Dimethoxyphenyl, Ethoxyphenyl, Diethoxyphenyl, Methoxybenzyl, Dimethoxybenzyl, Ethoxybenzyl, Diethoxybenzyl. Beispiele für Imidazolylethyl, in dem die Alkylgruppe bevorzugt 2 bis 4 C-Atome enthält, sind 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolylethyl oder -n-propyl oder -n-butyl. R_{a3} stellt bevorzugt H, Methyl oder Ethyl dar.

Bevorzugte Beispiele für Primäramino und Sekundäramino sind Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethyl-, Allyl-, Mono- oder Di-(1-hydroxy-eth-2-yl)-, Phenyl- und Benzylamino, Acetylamino, Isobutyrylamino und Benzoylamino.

In einer bevorzugten Ausführungsform stellt R_{b1} Wasserstoff dar. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform stellt R_{b5} Wasserstoff dar. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bedeuten R_{b2} und R_{b3} unabhängig voneinander H, F, Cl, Br, OH, SH, NH_2 , $NHOH$, $NHNH_2$, Methylamino, Dimethylamino, Benzoylamino, Isobutyrylamino, Methoxy, Ethoxy und Methylthio.

Einige Beispiele für Analoge der Purinreihe sind neben Purin Xanthin, Hypoxanthin, Adenin, N-Methyladenin, N-Benzoyladenin, 2-Methylthioadenin, 2-Aminoadenin, 6-Hydroxypurin, 2-Amino-6-chlorpurin, 2-Amino-6-methylthiopurin, Guanin, N-Isobutyrylguanin. Besonders bevorzugt sind Adenin, 2-Aminoadenin und Guanin, sowie deren basengeschützte Derivate.

Wenn B in Formel I einen Pyrimidinrest darstellt, so handelt es sich bevorzugt um einen Uracil-, Thymin- oder Cytosinrest der Formel III, IIIa, IIIb oder IIIc

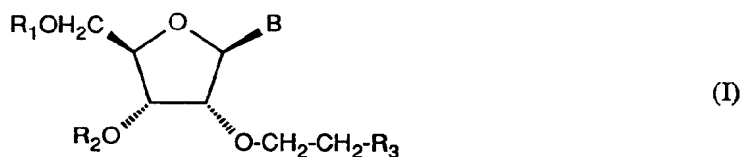


worin R_{b6} H oder C_1 - C_4 -Alkyl und R_{b8} H, OH, SH, NH_2 , $NHNH_2$, $NHOH$, NHO - C_1 - C_{12} -Alkyl, $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$, $-N=CH$ -Azacycloalkyl, F, Cl, Br, C_1 - C_{12} -Alkyl, Hydroxy- C_1 - C_{12} -alkyl, Amino- C_1 - C_{12} -alkyl, C_1 - C_{12} -Alkoxy, Benzyloxy, C_1 - C_{12} -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen, Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen, C_1 - C_{12} -Alkenyl oder C_1 - C_{12} -Alkyl bedeuten, und die NH_2 -Gruppe in Formel IIIb unsubstituiert oder mit C_1 - C_6 -Alkyl, Benzoyl oder einer Schutzgruppe substituiert ist, sowie die Dihydroderivate der Reste der Formeln III, IIIa, IIIb und IIIc. Bevorzugt stellt R_{b6} in Formel III H, C_1 - C_6 -Alkyl oder -Hydroxyalkyl, C_2 - C_6 -Alkenyl oder -Alkyl, F, Cl, Br, NH_2 , Benzoylamino, Mono- oder Di- C_1 - C_6 -alkylamino dar. Bevorzugt stellt R_{b8} in Formel IIIb und IIIc H, C_1 - C_6 -Alkyl oder -Alkoxy oder -Hydroxyalkyl, C_2 - C_6 -Alkenyl oder -Alkyl, F, Cl, Br, NH_2 , Benzoylamino, Mono- oder Di- C_1 - C_6 -alkylamino dar.

R_{b6} steht bevorzugt für H oder Methyl. R_{b8} in Formel III bedeutet bevorzugt H, F, Cl, Br, NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, C_1 - C_4 -Alkyl, C_2 - C_4 -Alkenyl oder C_2 - C_4 -Alkin-1-yl. R_{b8} in Formel IIIb und IIIc stellt bevorzugt H, C_1 - C_4 -Alkyl, besonders Methyl, C_2 - C_4 -Alkenyl, besonders Vinyl oder C_2 - C_4 -Alkin-1-yl, besonders 1-Propin-1-yl, oder NH_2 , $NHCH_3$ oder $(CH_3)_2N$ dar.

Einige Beispiele für Pyrimidinanaloge sind Uracil, Thymin, Cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Chloruracil, 5-Bromuracil, Dihydrouracil, 5-Methylcytosin, 5-Propinthymin und 5-Propincytosin.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I,



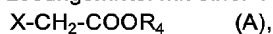
worin R_1 und R_2 unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen;
und B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und

(a) R_3 OH bedeutet,

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel IVa



worin R_{14} und R_{15} für gleiche oder verschiedene Schutzgruppen stehen und B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet, wobei funktionelle Gruppen im Basenrest B durch Schutzgruppen geschützt sind, in einem inerten Lösungsmittel mit einer Verbindung der Formel A umgesetzt



worin R_4 C_1 - C_4 -Alkyl und X Cl, Br, I, Tosyl-O oder Mesyl-O bedeutet;

und die Esterfunktion anschliessend mit NaBH_4 oder LiAlH_4 reduziert, wobei die entstehende OH-Gruppe vorübergehend mit einer Gruppe wie für R_1 definiert geschützt werden kann;

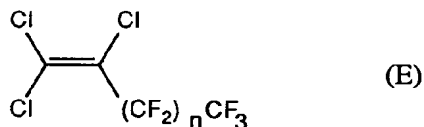
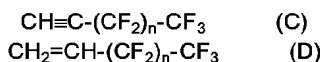
(b) R_3 F bedeutet,

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel I, worin R_3 OH bedeutet, mit einer Verbindung der Formel B umgesetzt



(c) R_3 $-(\text{CF}_2)_n\text{-CF}_3$ bedeutet, worin n für eine Zahl von 0 bis 7 steht,

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel IVa mit einer Verbindung der Formel C, D oder E umgesetzt



und anschliessend die gegebenenfalls vorhandene Doppelbindung oder chlorierte Doppelbindung katalytisch zu $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_n\text{CF}_3$ reduziert;

(d) R_3 OH, F oder $-(\text{CF}_2)_n\text{-CF}_3$ bedeutet,

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel IVb



worin R_{14} und R_{15} die oben erwähnte Bedeutung haben und A für eine Abgangsgruppe, bevorzugt Alkoxy, Acyloxy, Mesyl-O, Tosyl-O und besonders bevorzugt OCH_3 , $OCOCH_3$ und Benzoyloxy steht, nach einem der in (a) bis (c) beschriebenen Verfahren an der 2'-OH Gruppe substituiert und dann in an sich bekannter Weise den Basenrest B durch Substitution einführt [E. Lukevics, A. Zablocka, Nucleoside Synthesis, Ellis Horwood, New York (1991)]; und gegebenenfalls die Schutzgruppen R_{14} und R_{15} abspaltet.

Die Verbindungen der Formeln IVa und IVb, A, B, C, D und E sind bekannt, teilweise käuflich oder nach bekannten beziehungsweise analogen Verfahren herstellbar.

Inerte Lösungsmittel sind zum Beispiel Kohlenwasserstoffe, Halogenkohlenwasserstoffe, alkylierte Carbonsäureamide und Lactame, Ether, Nitrile wie Acetonitril, Dialkylsulfone oder -sulfoxide oder cyclische Sulfone und Sulfoxide.

Die Reaktionstemperaturen bei den Verfahrensstufen (a) bis (d) liegen zwischen -50 bis 200°C , bevorzugt zwischen 0 bis 90°C .

Die Umsetzungen werden ausser mit B vorteilhaft in Gegenwart von Basen durchgeführt, zum Beispiel Alkalimetallhydriden, -alkoholaten, -hydroxiden, -carbonaten, Trialkylaminen oder Diazabicycloundecen.

Die Isolierung der Verbindungen der Formel I und deren Reinigung erfolgt nach an sich bekannten Verfahren wie zum Beispiel Fällung oder Kristallisation und Filtration und chromatographischen Methoden.

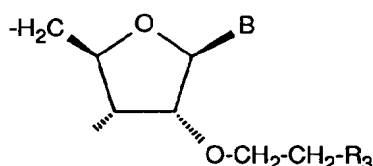
Aus den Verbindungen der Formel I können Oligonukleotide aufgebaut werden, die auf Grund ihrer Wechselwirkung mit Nukleinsäuren wertvolle biologische Aktivitäten aufweisen, und als pharmazeutische Wirkstoffe oder als Diagnostika verwendet werden können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Verbindungen der Formel I zur Herstellung von Oligonukleotiden, die gleiche oder verschiedene Monomereinheiten von Verbindungen der Formel I enthalten, jedoch mindestens eine Monomereinheit von Verbindungen der Formel I in Kombination mit Monomereinheiten von anderen natürlichen oder synthetischen Nukleosiden, wobei die Oligonukleotide 2 bis 200 Monomereinheiten enthalten. Bevorzugt enthalten die Oligonukleotide 2 bis 100, besonders bevorzugt 2 bis 50, und insbesondere bevorzugt 4 bis 30 Monomereinheiten. Bevorzugt sind Oligonukleotide, die gleiche oder verschiedene Monomereinheiten von Verbindungen der Formel I enthalten. Bevorzugt sind ferner Oligonukleotide, die zusätzlich Monomereinheiten von synthetischen oder natürlichen Nukleosiden enthalten, die sich von D-Ribose oder 2-Desoxyribose ableiten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Oligonukleotide der Formel V



worin x eine Zahl von 0 bis 200 und Y eine Nukleotid-Brückengruppe bedeuten, U, V und W je für sich gleiche oder verschiedene Reste von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden darstellen und mindestens einer der Reste U, V und/oder W einen Rest der Formel VI



(VI)

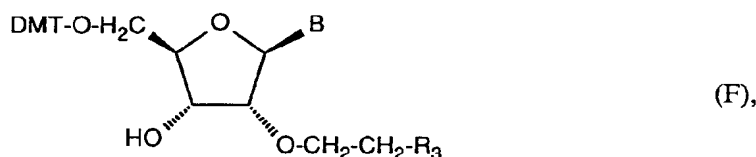
bedeutet, und B und R_3 die für die Verbindungen der Formel I angegebenen Bedeutungen haben einschliesslich der Bevorzugungen und Beispiele.

Eine bevorzugte Brückengruppe Y ist die in natürlichen Oligonukleotiden vorkommende Gruppe $-P(O)O^-$. Beispiele für weitere Brückengruppen sind $P(O)S^-$, $-P(S)S^-$, $-P(O)R_{16}$, $P(O)NR_{17}R_{18}$, oder $-CH_2-$, worin R_{16} H oder C_1 - C_6 -Alkyl darstellt und R_{17} und R_{18} unabhängig voneinander die Bedeutung von R_{16} haben. In Formel V steht x bevorzugt für eine Zahl von 0 bis 100, besonders bevorzugt für eine Zahl von 1 bis 50 und insbesondere bevorzugt für eine Zahl von 3 bis 29. Die Reste der Formel VI können endständig oder in der Nukleotidsequenz gebunden sein, wobei alle oder mehrere, zum Beispiel 2 bis 5 Reste der Formel VI aufeinander folgen können, oder die Reste der Formel VI können zwischen Resten von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden gebunden sein, oder es können Mischformen dieser Verteilungen in der Nukleotidsequenz vorliegen.

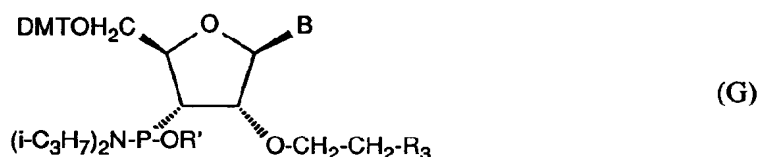
Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform sind Oligonukleotide der Formel V, worin x eine Zahl von 2 bis 50, bevorzugt 2 bis 30 darstellt, Y für die Gruppe $-P(O)O^-$ steht, U, V und W je für sich gleiche oder verschiedene Reste eines natürlichen Nukleosids bedeuten und mindestens einer der Reste U, V oder W der Formel VI entspricht. Als natürliche Nukleoside kommen Adenosin, Cytidin, Guanosin, Uridin, 2-Aminoadenin, 5-Methylcytosin, 2'-Desoxyadenosin, 2'-Desoxycytidin, 2'-Desoxyguanosin und Thymidin in Frage. Als natürliche Nukleosidbasen sind besonders Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin und Uracil zu nennen. Die Reste der

Formel VI können endständig oder in der Nukleotidsequenz gebunden sein, wobei alle oder mehrere, zum Beispiel 2 bis 5 gleiche oder verschiedene Reste der Formel VI aufeinander folgen können, oder gleiche oder verschiedene Reste der Formel VI zwischen Resten von natürlichen Nukleosiden gebunden sind, oder Mischformen dieser Verteilungen in der Nukleotidsequenz vorliegen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform von Oligonukleotiden der Formel V entsprechen sämtliche Reste U, V und W gleichen oder verschiedenen Resten der Formel VI. Bevorzugt stellt x eine Zahl von 3 bis 29 dar und bevorzugt sind insgesamt 1 bis 12 Reste der Formel VI enthalten.

Die Herstellung der erfindungsgemässen Oligonukleotide kann in an sich bekannter Weise nach verschiedenen Verfahren in gegebenenfalls automatisierten und zusammen mit Verfahrensvorschriften käuflichen DNA-Synthesizem erfolgen. Im Falle der Brückengruppe $-P(O)O^{\ominus}-$ kann zum Beispiel das Phosphortriester-
verfahren, das Phosphittriesterverfahren oder das H-Phosphonatverfahren angewendet werden, die dem Fachmann geläufig sind. Beim Phosphittriesterverfahren kann man zum Beispiel so vorgehen, dass man die Nukleoside der Formel I, worin R_1 und R_2 je H bedeuten, mit einem Schutzgruppenreagenz, zum Beispiel 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-chlorid zu einem Nukleosid der Formel F umsetzt



und die Verbindung der Formel F mit Hilfe eines "linkers", zum Beispiel Bernsteinsäureanhydrid, an ein festes Trägermaterial bindet, zum Beispiel an Controlled Pore Glass (CPG), das langkettige Alkylaminogruppen enthält. In einem separaten Verfahren wird die Hydroxylgruppe der Verbindung der Formel F derivatisiert, zum Beispiel zu einem Phosphoramidit unter Verwendung von $R'OP[N(i\text{-Propyl})_2]_2$ zu einer Verbindung der Formel G



wobei R' zum Beispiel β -Cyanoethyl darstellt.

Nach dem Abspalten der Schutzgruppe wie zum Beispiel der DMT-Gruppe des an den Träger gebundenen Materials koppelt man unter Abspaltung von $-N(i\text{-C}_3\text{H}_7)_2$ mit der Verbindung der Formel F, blockiert eventuell vorhandene freie Hydroxylgruppen (capping) und oxidiert dann das gebildete Phosphit zum Phosphat. Nach dem Entschützen des Dimeren wiederholt man den Reaktionszyklus mit einer Verbindung der Formel G, bis man ein Oligomer mit der gewünschten Anzahl an Monomereinheiten synthetisiert hat, und löst das Produkt vom Trägermaterial ab. Auf diese Weise erhält man Oligonukleotide, in denen sämtliche Reste U, V und W gemäss Formel V aus Resten der Formel VI bestehen. Auf diese Weise sind auch Oligonukleotide mit beliebigen Monomereinheiten in beliebiger Sequenz herstellbar, je nach Verwendung synthetischer, natürlicher und erfindungsgemässer Nukleosidbausteine in den einzelnen Reaktionszyklen.

Die erfindungsgemässen Verbindungen der Formel I, worin R_1 und R_2 je H bedeuten, weisen antivirale und antiproliferative Eigenschaften auf und können demgemäss als Arzneimittel Verwendung finden. Die erfindungsgemässen Oligonukleotide weisen zudem eine hohe Stabilität gegenüber einem Abbau durch Nukleasen auf. Besonders überraschend ist ihre ausgezeichnete Paarung mit komplementären Nukleinsäuresträngen, vor allem vom RNA-Typ. Zusätzlich zeigen sie eine unerwartet hohe zelluläre Aufnahme. Die erfindungsgemässen Oligonukleotide eignen sich daher besonders für die Antisense-Technologie, das heisst zur Inhibition der Expression unerwünschter Proteinprodukte durch die Bindung an geeignete komplementäre Nukleotidsequenzen von mRNA (EP 266,099, WO 87/07300 und WO 89/08146). Sie können zur Behandlung von Infektionen und Krankheiten zum Beispiel durch die Blockierung der Expression von bioaktiven Proteinen auf der Stufe der Nukleinsäuren (zum Beispiel Onkogene) eingesetzt werden. Die erfindungsgemässen Oligonukleotide eignen sich auch als Diagnostika und können als Gensonden zum Nachweis von viralen Infektionen oder genetisch bedingten Krankheiten durch selektive Interaktion auf der Stufe von einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäuren verwendet werden ("gene probes"). Im besonderen - bedingt durch die erhöhte

Stabilität gegenüber Nukleasen - ist eine diagnostische Anwendung nicht nur in vitro sondern auch in vivo (zum Beispiel Gewebeproben, Blutplasma und Blutserum) möglich. Solche Verwendungsmöglichkeiten sind zum Beispiel in der WO 91/06556 beschrieben.

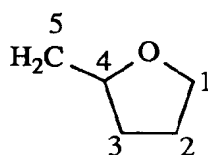
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemässen Oligonukleotide als Diagnostika zum Nachweis von viralen Infektionen oder genetisch bedingten Krankheiten.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft auch die erfindungsgemässen Nukleoside der Formeln I sowie die Oligonukleotide der Formel V zur Anwendung in einem therapeutischen Verfahren zur Behandlung von Krankheiten bei Warmblütern einschliesslich des Menschen durch Inaktivierung von Nukleotidsequenzen im Körper. Die Dosierung bei Verabreichung an Warmblüter von etwa 70 kg Körpergewicht kann zum Beispiel 0,01 bis 1000 mg pro Tag betragen. Die Verabreichung erfolgt vorzugsweise in Form pharmazeutischer Präparate parenteral, zum Beispiel intravenös oder intraperitoneal.

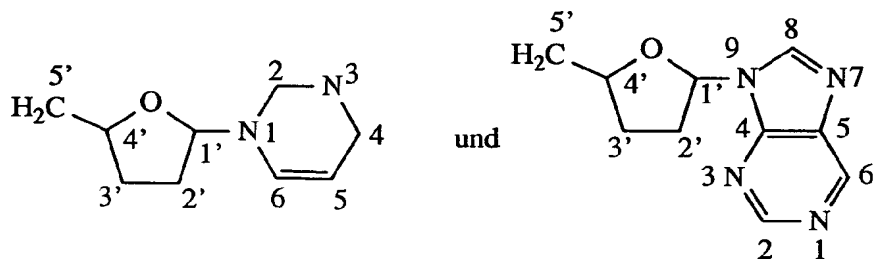
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Präparat, enthaltend eine wirksame Menge eines Nukleosids der Formeln I oder eines Oligonukleotids der Formeln V alleine oder zusammen mit anderen Wirkstoffen, ein pharmazeutisches Trägermaterial vorzugsweise in einer signifikanten Menge und gegebenenfalls Hilfsstoffe.

Man kann die pharmakologisch wirksamen erfindungsgemässen Nukleoside und Oligonukleotide in Form von parenteral verabreichbaren Präparaten oder von Infusionslösungen verwenden. Solche Lösungen sind vorzugsweise isotonische wässrige Lösungen oder Suspensionen, wobei diese zum Beispiel bei lyophilisierten Präparaten, welche die Wirksubstanz allein oder zusammen mit einem Trägermaterial, zum Beispiel Mannit, enthalten, vor Gebrauch hergestellt werden können. Die pharmazeutischen Präparate können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe, zum Beispiel Konservier- Stabilisier-, Netz- und/oder Emulgiermittel, Löslichkeitsvermittler, Salze zur Regulierung des osmotischen Drucks und/oder Puffer enthalten. Die pharmazeutischen Präparate, die gewünschtenfalls weitere pharmakologisch wirksame Stoffe wie zum Beispiel Antibiotika enthalten können, werden in an sich bekannter Weise, zum Beispiel mittels konventioneller Lösungs- oder Lyophilisierungsverfahren, hergestellt, und enthalten etwa 0,1 % bis 90 %, insbesondere von etwa 0,5 % bis etwa 30 %, zum Beispiel 1 % bis 5 % Aktivstoff(e).

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung. Den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren liegt die Nummerierung der Kohlenstoffatome in den folgenden cyclischen Kohlenstoffgerüsten zu Grunde:
Ausgangsverbindungen:



Nukleoside (Beispiele):



Verwendete Abkürzungen im Text und in den Formeln:

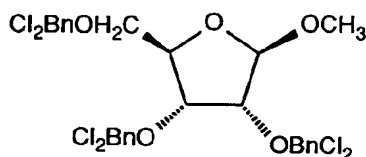
DMF	Dimethylformamid
CIBnCl ₂	2,4-Dichlorbenzylchlorid
Bn	Benzyl
Ac	Acetyl
φ	Phenyl
BSA	N,N-Bis(trimethylsilyl)acetamid
DBU	Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
BOM-Cl	Benzyloxymethylchlorid

DMTCI 4,4'-Dimethoxytritylchlorid
THF Tetrahydrofuran

A) Herstellung von Nukleosid-Analogen

Beispiel A1:

Zu einer Vorlage von 13,5 g NaH in 130 ml DMF werden bei 60°C 28,0 g 1-Methylribose zugetropft. Nach Ende der H₂-Entwicklung werden 110,0 g ClBnCl₂ zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 16 Stunden bei 25°C weitergerührt. Um noch vorhandenes NaH zu zerstören tropft man vorsichtig Methanol zu und giesst das Reaktionsgemisch dann auf Eis/Wasser. Der klumpige Niederschlag wird abfiltriert und mit Acetonitril gut nachgewaschen. Man erhält die Verbindung (A1).

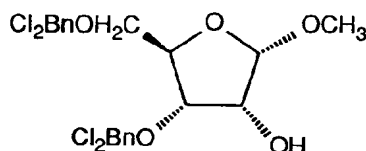


(A1).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): Das H-C(1)-Proton erscheint bei 5,0 ppm als Singulett. MS: 638 (M⁺)

Beispiel A2:

65,9 g des in Beispiel A1 hergestellten Produktes werden in 600 ml Methylenchlorid gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann tropft man 121 ml SnCl₄ in 800 ml Methylenchlorid zu und lässt bei 3°C stehen. Nach 26 Stunden werden nochmals 2 ml SnCl₄ zugegeben. Nach total 35 Stunden wird die Reaktionslösung vorsichtig auf 700 ml einer gesättigten NaHCO₃-Lösung gegossen. Nach Verdünnung mit 400 ml Methylenchlorid wird der Sn-haltige Niederschlag abfiltriert. Die organische Phase des Filtrats wird mit MgSO₄ getrocknet und zur Verbindung (A2) eingedampft.

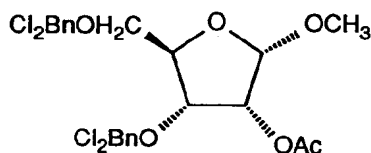


(A2).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): Das H-C(1)-Proton erscheint bei 4,90 ppm als Doublett mit J=5 Hz.

Beispiel A3:

125,9 g des in Beispiel A2 erhaltenen Produktes werden in 1 l Pyridin gelöst. Bei 20°C werden 25,5 g Acetanhydrid und 1 g 4-Dimethylaminopyridin zugegeben. Anschliessend wird 17 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wird in 1 l Wasser aufgenommen, mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird mit MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Schliesslich wird der Rückstand mit Hexan zur Kristallisation gebracht. Man erhält die Verbindung (A3).



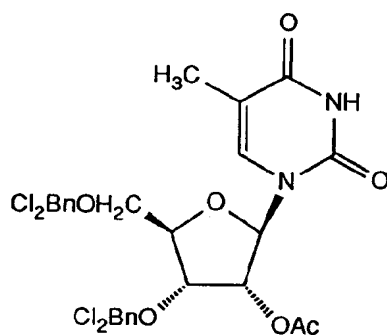
(A3).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 5,15 [d, J=4,5 Hz, H-C(1)]; 3,50 (s, OCH₃); 2,17 (s, OCOCH₃); MS: 522 (M⁺)

[α]_D²⁰=87,4±1,0°, CHCl₃ (0,998%)

Beispiel A4:

24 g Thymin werden in 100 ml 1,2-Dichlorethan aufgeschlämmt. Nach Zugabe von 116,4 g BSA wird unter Rückfluss erhitzt bis eine klare Lösung entsteht. Danach wird auf 50°C abgekühlt und es werden 50 g des in Beispiel A3 hergestellten Produktes sowie 27,5 g Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester zugegeben. Es wird während 20 Stunden bei 70°C gerührt und anschliessend auf 300 ml NaHCO₃-Lösung gegossen und filtriert. Nach Extraktion mit Dichlorethan wird mit MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Schliesslich wird der Rückstand mit Methanol zur Kristallisation gebracht. Man erhält die Verbindung (A4).

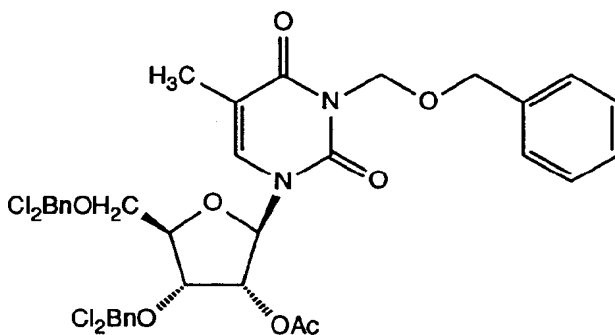


(A4).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 8,25 (s, NH); 6,10 [d, J=4,5 Hz, H-C(1')]; 2,13 (s, OCOCH₃); 1,66 (s, CH₃)
MS: 616 (M⁺)

Beispiel A5:

85 g des in Beispiel A4 hergestellten Produktes werden in 850 ml Acetonitril suspendiert. Es werden bei Raumtemperatur 24,2 g DBU und 24,9 g BOM-Cl zugetropft. Nach 20 Stunden Rühren wird das Reaktionsgemisch auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird mit MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Man erhält die Verbindung (A5).

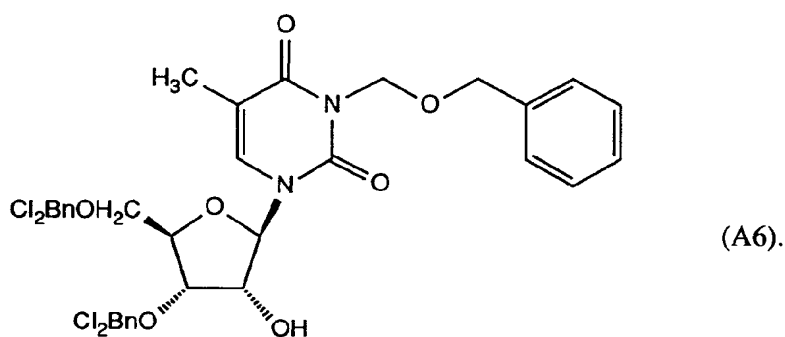


(A5).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 6,05 [d, J=4,5 Hz, H-C(1')]; 5,5 (AB, CH₂); 5,37 [dd, H-C(2')]; 2,13 (s, OCOCH₃); 1,55 (s, CH₃)
MS: 736 (M⁺)

Beispiel A6:

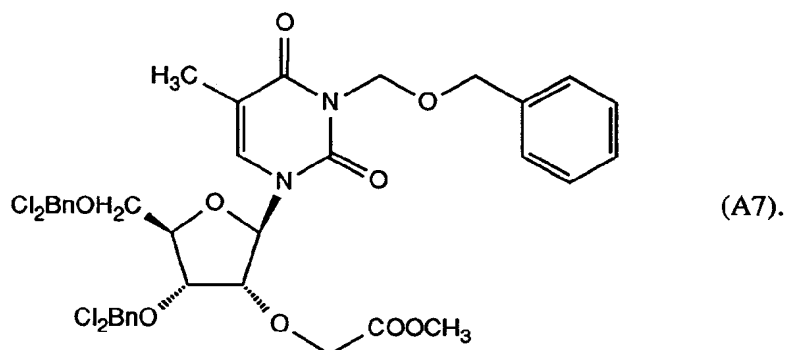
106 g des in Beispiel A5 hergestellten Produktes werden in 1 l THF suspendiert. Es werden 26 g einer 30 %igen NaOCH₃/CH₃OH-Lösung zugetropft. Nach 2,5 Stunden Rühren wird die Reaktionslösung auf Wasser gegossen, mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung versetzt und mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach Trocknung mit MgSO₄ wird der Extrakt eingedampft. Man erhält die Verbindung (A6).



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 5,93 [d, J=5 Hz, H-C(1')]; 5,5 (AB, CH₂); 3,03 (d, J=6,5 Hz, OH); 1,72 (s, CH₃)
 15 MS: 694 (M⁺)

Beispiel A7:

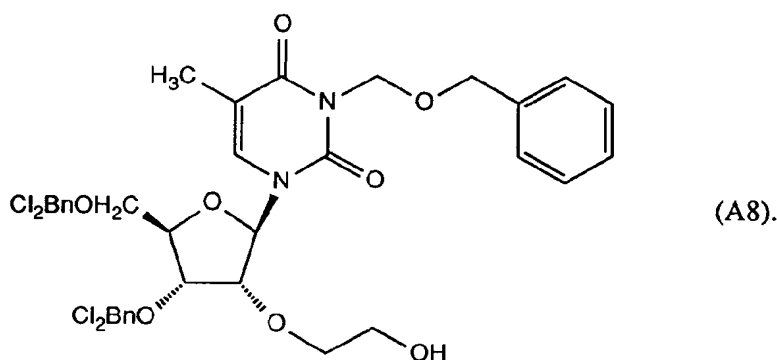
79,4 g des in Beispiel A6 erhaltenen Produktes werden in 800 ml THF gelöst. Nach Zugabe von 3,3 g NaH
 20 wird kurz aufgekocht und anschliessend werden bei 40°C 21 g Bromessigsäuremethylester zugetropft. Das
 Reaktionsgemisch wird insgesamt 27 Stunden bei 60°C gerührt, wobei nach 16 Stunden und nach 20 Stunden
 je 1 g NaH und 2 ml Bromessigsäuremethylester zugegeben werden. Schliesslich wird das Reaktionsgemisch
 auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird mit MgSO₄ getrocknet und ein-
 gedampft. Dabei erhält man die Verbindung (A7).



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 7,70 [s, H-C(6)]; 5,92 [s, H-C(1')]; 5,48 (AB, CH₂); 3,75 (s, OCH₃); 1,58 (s, CH₃).
 40 MS: 766 (M⁺).

Beispiel A8:

37 g des gemäss Beispiel A7 gewonnenen Produktes werden in 400 ml THF gelöst. Man gibt bei 20°C por-
 45 tionsweise 1,5 g LiBH₄ zu und rührt 1 Stunde lang. Danach giesst man das Reaktionsgemisch vorsichtig auf
 500 ml Wasser und neutralisiert mit 32 ml 2 N wässriger Salzsäure. Nach Extraktion mit Essigsäureethylester
 und Eindampfen erhält man die Verbindung (A8).

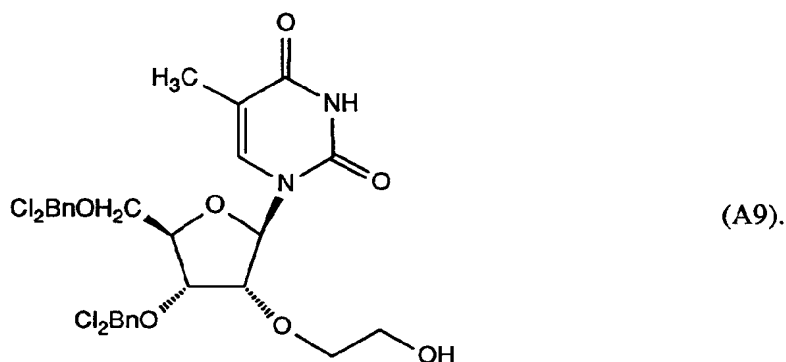


15 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 7,65 [s, $\text{H-C}(6)$]; 5,96 [s, $\text{H-C}(1')$]; 5,50 (AB, CH_2); 2,57 (breites s, OH); 1,60 (s, CH_3).
MS: 738 (M^+).

20 Beispiel A9:

20,0 g des in Beispiel A8 hergestellten Produktes werden in 200 ml THF gelöst und über 2 g Pd/C (5%) bei 25°C und unter Normaldruck 4,5 Stunden hydriert (H_2 -Aufnahme 102 %). Nach Filtration und Eindampfen des Filtrats wird der Rückstand in 170 ml Methanol gelöst und mit einer 30%igen $\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ -Lösung auf einen pH-Wert von 11 eingestellt. Nach 24 Stunden giesst man auf 250 ml Wasser, säuert mit 2 N wässriger Salzsäure an und extrahiert mit Essigsäureethylester. Der Extrakt wird mit MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Man erhält die Verbindung (A9).

25



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 9,24 (s, NH); 7,90 [s, $\text{H-C}(6)$]; 5,99 [s, $\text{H-C}(1')$]; 2,68 (t, OH); 1,60 (s, CH_3).
MS: 618 (M^+).

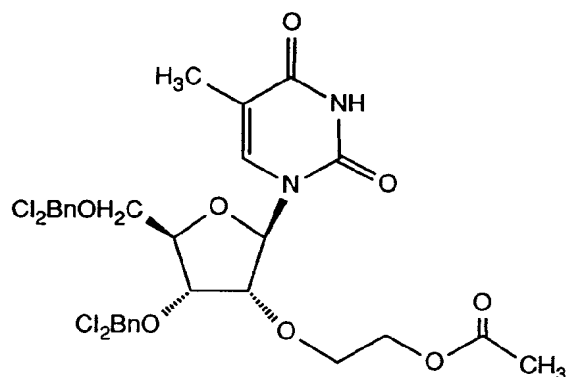
45 Beispiel A10:

4,2 g des in Beispiel A9 hergestellten Produktes werden in 50 ml Pyridin gelöst und nach Zugabe von 2,4 g Acetanhydrid wird 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird auf 100 ml 2 N HCl gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird mit 2 N HCl und Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Man erhält die Verbindung (A10).

50

5

10



(A10).

15 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 9,28 (s, NH); 7,67 [s, $\text{H-C}(6)$]; 5,95 [s, $\text{H-C}(1')$]; 2,00 (s, CH_3); 1,60 (s, CH_3).
MS: 663 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

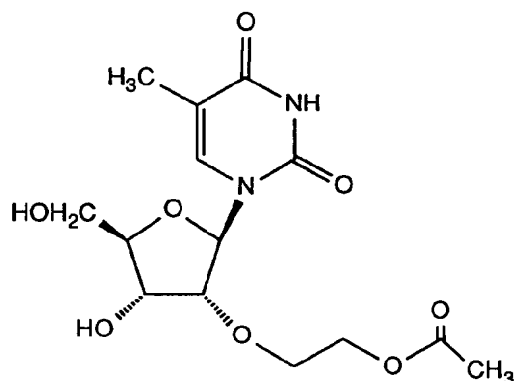
Beispiel A11:

20

4,2 g des in Beispiel A10 hergestellten Produktes werden in 50 ml Methanol in Gegenwart von 2,09 g wasserfreiem Natriumacetat über 0,8 g Pd/C (5%) bei 35°C und unter Normaldruck hydriert. Nach 58 Stunden wird das Hydriergemisch filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird zur Entfernung von Salzen über eine kleine Fritte mit Kieselgel chromatographiert (Essigsäureethylester/Methanol 9:1). Man erhält die Verbindung (A11).

25

30



(A11).

35

40 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): 10,1 (s, NH); 7,61 [s, $\text{H-C}(6)$]; 5,64 [d, $J=6$ Hz, $\text{H-C}(1')$]; 1,70 (s, CH_3); 1,57.
MS: 379 ($\text{M}+\text{Cl}$) $^-$.

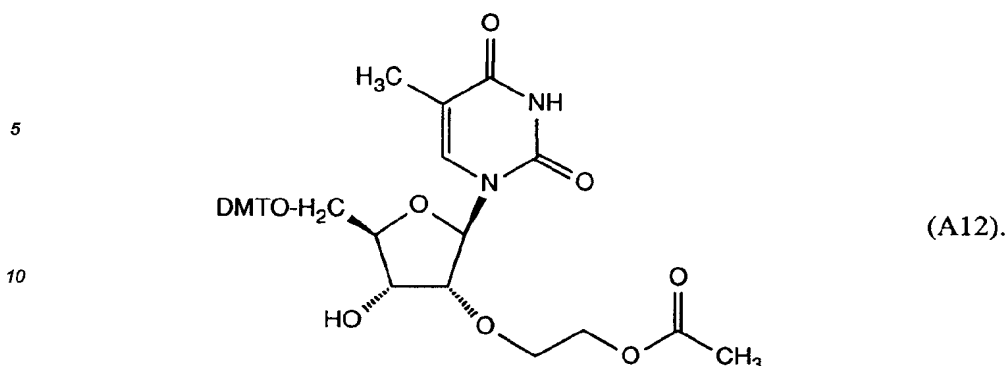
Beispiel A12:

45

2,27 g des in Beispiel A11 hergestellten Produktes werden zweimal in Pyridin aufgenommen und eingedampft. Man nimmt erneut in 30 ml Pyridin auf und gibt 2,57 g DMTCI dazu. Nach 20 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch mit 250 ml Essigsäureethylester verdünnt und auf 50 ml Wasser gegossen. Die organische Phase wird mit MgSO_4 getrocknet und eingeeengt. Den Rückstand chromatographiert man über Kieselgel (Toluol/Essigsäureethylester/Triethylamin 49:49:2). Man erhält die Verbindung (A12).

50

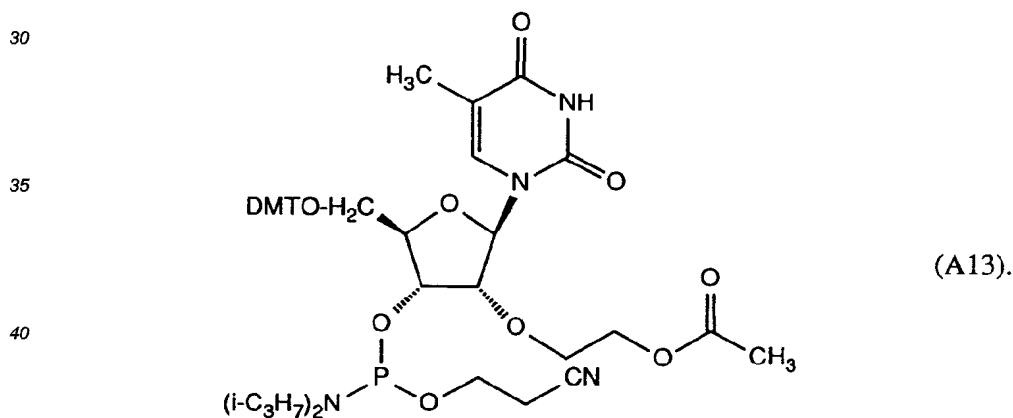
55



15 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 9,22 (s, NH); 7,70 [s, $\text{H-C}(6)$]; 5,94 [d, $J=1,5$ Hz, $\text{H-C}(1')$]; 3,78 (s, OCH_3); 2,19 (s, CH_3); 1,36 (s, CH_3).
MS: 706 ($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$.

Beispiel A13:

20 2,70 g des in Beispiel A12 erhaltenen Produktes werden zu einer Vorlage aus 0,93 g Düsopropylammoniumtetrazolid, 1,51 g 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetrakisopropylphosphordiamidit und 30 ml Methylenchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach auf eine gesättigte wässrige NaHCO_3 -Lösung gegossen. Die organische Phase wird mit MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Den Rückstand chromatographiert man über Kieselgel (Ethanol/Essigsäureethylester 1:1 mit 2 % Zusatz von Triethylamin). Der erhaltenen Schaum wird in 1 ml Methyl-t-butylether gelöst und bei 0°C in Pentan getropft. Man erhält die Verbindung (A13) (Diastereoisomere, 1:1).



45 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 7,74 [s, $\text{H-C}(6)$] und 7,68 [s, $\text{H-C}(6)$]; 6,08 [d, $J=4$ Hz, $\text{H-C}(1)$]; 5,97 [d, $J=4$ Hz, $\text{H-C}(1')$]; $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3): 150,174 und 150,038 MS: 847 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

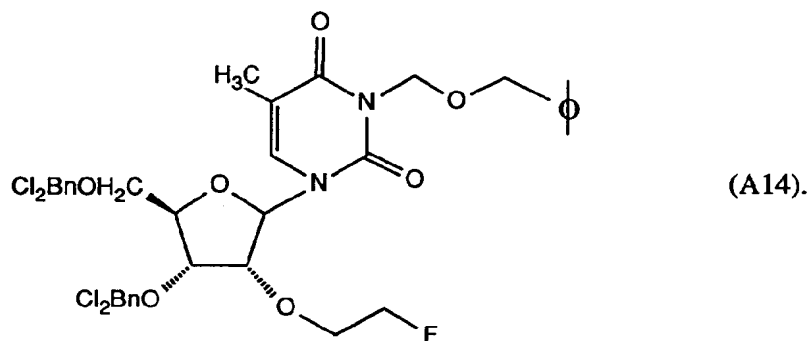
Beispiel 14:

50 20,6 g des in Beispiel A8 erhaltenen Produktes werden in 200 ml CH_2Cl_2 gelöst. Bei 5°C werden 4,35 g Diethylamino-schwefeltrifluorid (DAST) zugetropft und das Reaktionsgemisch 3 Stunden bei 5°C gerührt. Danach giesst man die Lösung auf 300 ml gesättigte NaHCO_3 -Lösung und extrahiert mit CH_2Cl_2 . Der Extrakt wird über MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird chromatographiert (Kieselgel, Toluol/Essigsäureethylester 1:1). Man erhält die Verbindung (A14).

55

5

10



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 7,68 [s, H-C(6)]; 5,92 [s, H-C(1')]; 5,50 [AB, CH₂] 1,58 (s, CH₃). ¹⁹F-NMR (CDCl₃): -223,74 (t, CH₂F). MS: 758 (M+NH₄)⁺.

15

Beispiel A15:

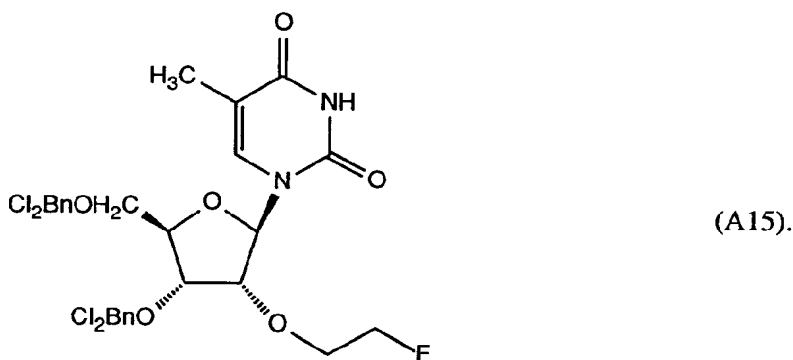
20

1,30 g des in Beispiel A14 erhaltenen Produktes werden in 26 ml THF gelöst und über 0,65 g Pd/C (5 %) bei 20°C und Normaldruck hydriert. Nach 0,5 Stunden wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird in Methanol (15 ml) aufgenommen und mit NaOMe/MeOH-Lösung auf pH 11 eingestellt. Nach 20 Stunden Rühren wird auf 20 ml Wasser gegossen und mit Essigsäuremethylester extrahiert. Nach dem Eindampfen erhält man die Verbindung (A15).

25

30

35



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 8,99 (s, NH); 7,61 [s, H-C(6)]; 5,88 [d, J=1,5Hz, H-C(1')]; 1,52 [s, CH₃]. MS: 621 (M+H)⁺.

40

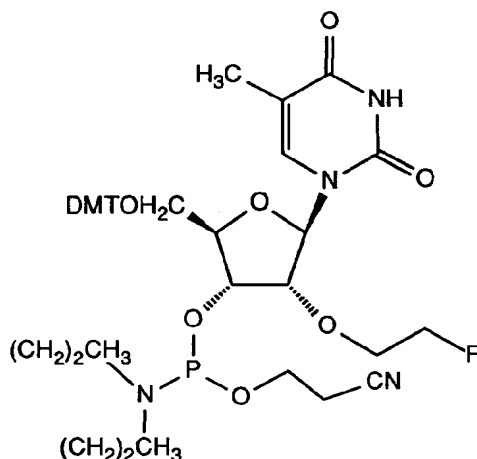
Beispiel A16:

45

Analog den Arbeitsvorschriften (A11), (A12) und (A13) wird die Verbindung (A15) in das Phosphoramidit (A16) (Diastereoisomere, 1:1) überführt.

50

55



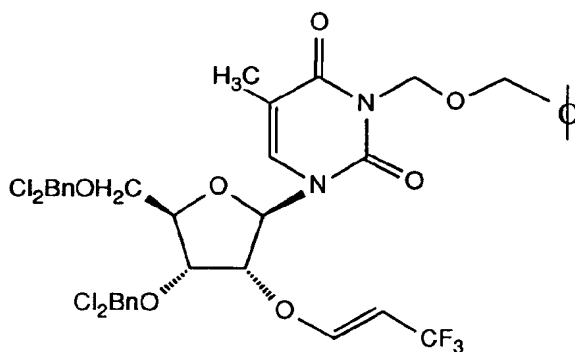
(A16)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl_3): 7,75 [s, H-C(6)] und 7,68 [s, H-C(6)]; 6,06 [d, J=4 Hz, H-C(1')] und 6,00 [d, J= 4 Hz, H-C(1')].

³¹P-NMR (CDCl_3): 150,107.

Beispiel A17:

20,0 g der Verbindung (A6) werden in 200 ml THF gelöst und mit 0,83 g NaH (100 %) bis zur Beendigung der H_2 -Entwicklung auf 60°C gehalten. Nach dem Abkühlen wird zu dieser Lösung im Autoklaven 48,0 g Tri-
fluorpropin aufgespresst und auf 50°C erwärmt. Nach 48 Stunden wird das Reaktionsgemisch zur Hälfte auf-
konzentriert, dann auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird getrocknet
(MgSO_4) und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel chromatographiert (n-Hexan/Essigester 4:1).
Man erhält die Verbindung (A17).



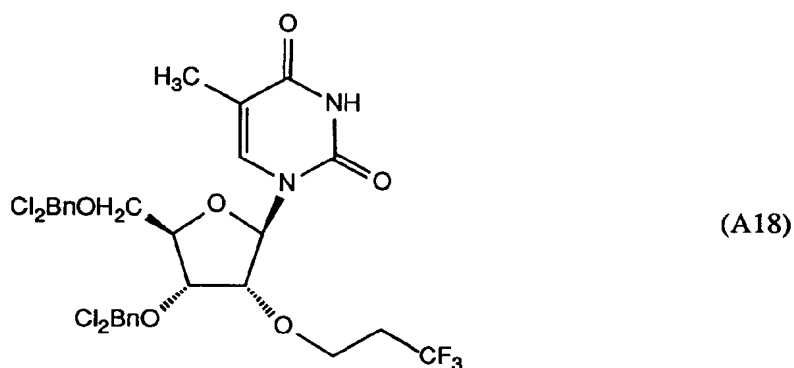
(A17)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl_3): 7,72 [s, H-C(6)]; 6,80 (d, J=8Hz, $\text{CH}=\text{C}$); 5,82 [s, H-C(1')]; 5,48 (AB, CH_2); 4,85 (m, $\text{CH}=\text{C}$); 1,58 (s, CH_3).

MS:789 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Beispiel A18:

10,0 g der Verbindung (A17) werden in 200 ml THF gelöst und über 2 g Pd/C bei Raumtemperatur und
Normaldruck hydriert. Nach 1 Stunde wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der Rück-
stand wird analog dem Beispiel A15 mit NaOMe nachbehandelt und chromatographiert (Kieselgel; n-Hexan/Es-
sigssäureethylester 2:1). Man erhält die Verbindung (A18).

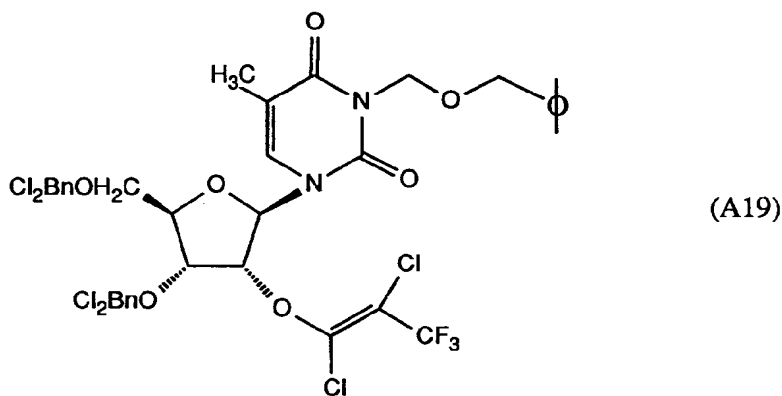


15 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 9,00 (s, NH); 7,66 [s, H-C(6)]; 5,93 [d, $J=1,5$ Hz, H-C(1')]; 1,61 (s, CH_3).
 $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): -65,23.
 MS: 705 ($\text{M}+\text{Cl}$) $^-$.

20 Beispiel A19:

8,9 g der Verbindung (A6) werden in 90 ml THF gelöst und mit 0,34 g NaH (100 %) kurz aufgeköcht. Nach dem Abklingen der H_2 -Entwicklung werden bei 20°C 5,1 g 1,1,2-Trichlor-3,3,3-trifluorpropen zugetropft und anschließend 5 Stunden bei 55°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach dem Eindampfen wird chromatographiert (Kieselgel, Toluol/Essigsäureethylester 4:1). Man erhält die Verbindung (A19) als cis/trans(etwa 1:1)-Gemisch.

25



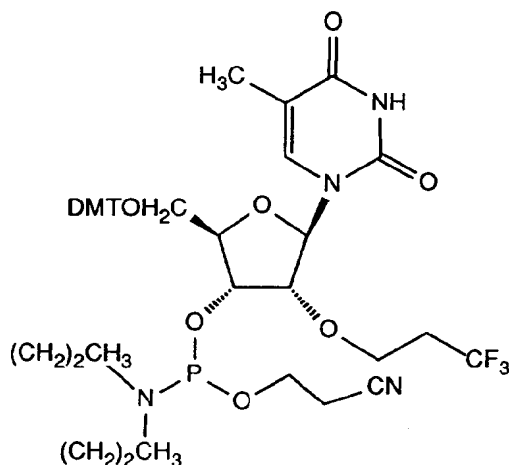
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 7,63 und 7,60 [je s, je H-C(6)]; 5,91 und 5,87 [je s, je H-C(1')]; 1,61 und 1,57 (je s, je CH_3).
 MS: 891 ($\text{M}+\text{Cl}$) $^-$.

45 Beispiel A20:

Wird die Verbindung (A18) oder (A19) analog den obigen Beispielen entschützt und in das Phosphoramidit überführt, so erhält man die Verbindung (A20) (Diastereoisomere 1:1).

50

55



(A20)

¹H-NMR (CDCl₃): 8,6 (breites s, NH); 7,74 und 7,69 [je s, je H-C(6)]; 5,97 und 5,94 [je d, J=4 Hz, je H-C(1')].
³¹P-NMR (CDCl₃): 150,287 und 150,035 ppm.

Beispiel B:

Herstellung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide werden unter Verwendung der erfindungsgemässen dimethoxytritylierten und 3'-aktivierten [3'-(β-Cyanoethoxy-di(i-propylamino)phosphoramidit)] Nukleoside bzw. solchen natürlichen aktivierten Nukleosiden an einen festen Träger gebunden (Controlled Pore Glas, CPG) und die Synthese auf einem DNA-Synthesiser (Applied Biosystems, Modell 380 B, Standard Phosphoramiditchemie und Iodoxidation) gemäss den Standardprotokollen des Herstellers durchgeführt [vergleiche auch "Oligonucleotide synthesis a practical approach" M.J Gait; IRL Press 1984 (Oxford-Washington DC)]. Nach der Kopplung des letzten Nukleosidbausteins wird das 5'-geschützte Oligonukleotid unter gleichzeitiger Abspaltung aller übrigen Schutzgruppen durch Behandlung mit konzentriertem wässrigem Ammoniak über Nacht vom Träger abgelöst und anschliessend unter Verwendung von 50 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 7)/Acetonitril durch "reverse-phase" HPLC gereinigt. Anschliessend wird die 5'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe durch 20-minütige Behandlung mit 80 %-iger wässriger Essigsäure abgespalten, das Oligonukleotid mit Ethanol ausgefällt und durch Zentrifugation isoliert. Die Reinheit des Oligonukleotids wird durch Gelelektrophorese (Polyacrylamid), seine Identität mittels matrixunterstützter Laserdesorptions-Time-of-flight Massenspektroskopie (MALDI-TOF MS) überprüft.

Beispiel C1:

Affinität; Wechselwirkung der Oligonukleotide (Antisense) mit komplementären Oligoribonukleotidsequenzen (Sense)

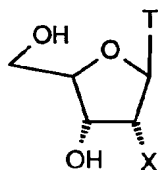
Die Wechselwirkung der Oligonukleotide mit den entsprechenden basenkomplementären Oligomeren der natürlichen Ribonukleotide wird durch das Aufzeichnen von UV-Schmelzkurven und den daraus ermittelten T_m-Werten charakterisiert. Diese Standardmethode ist zum Beispiel von Marky, L.A., Breslauer, K.J., Biopolymers 26:1601-1620 (1987) beschrieben.

Es wird eine Lösung der Oligonukleotide und der entsprechenden basenkomplementären natürlichen Oligoribonukleotide in 10 mM Phosphatpuffer, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH = 7,0 (c = 4 · 10⁻⁶ M/Oligonukleotid) hergestellt und die Änderung der Extinktion bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur (15 bis 95°C) aufgezeichnet. Aus den erhaltenen Schmelzkurven wird der T_m-Wert ermittelt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Affinität

5 (a) TTTTtCTCTCTCTCT (vs. RNA)

10



15

X	T _m (°C)	ΔT _m (°C)
---	---------------------	----------------------

20

H	51,8	0
	53,1	+ 1,3

25

	53,5	+ 1,7
--	------	-------

30

	53,0	+ 1,2
	53,0	+ 1,2

35

40

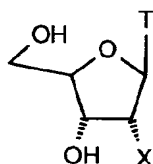
45

50

55

(b) tCCAGGtGtCCGCAtC (vs. RNA)

5



10

X	T _m (°C)	ΔT _m (°C)/mod.
---	---------------------	---------------------------

15

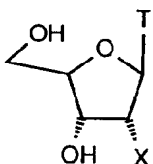
H	62,3	0
	70,5	+ 1,0
	68,0	+ 1,4
	65,1	+ 0,7

20

25

(c) GCGttttttttGCG (vs. RNA)

30



35

X	T _m (°C)	ΔT _m (°C)/mod.
---	---------------------	---------------------------

40

H	50,2	0
	62,4	+ 1,2
	61,9	+ 1,2
	58,1	+ 0,8

45

50

Beispiel D2:

Spezifität; Wechselwirkung des Oligonukleotids mit basenkomplementären Oligoribonukleotiden, in welche ein falsches Nukleosid (Y) eingebaut wurde

Man stellt Lösungen des Oligonukleotids mit den entsprechenden basenkomplementären Oligonukleotiden der Sequenzen r(GGA CCG GAA YGG TAC GAG) in 10 mM Phosphatpuffer, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 7, ($c = 4 \cdot 10^{-6}$ M/Oligonukleotid) her und misst die Änderung der Extinktion bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur (15°C bis 95°C). Aus den Kurven wird der T_m-Wert ermittelt. Die Ergebnisse

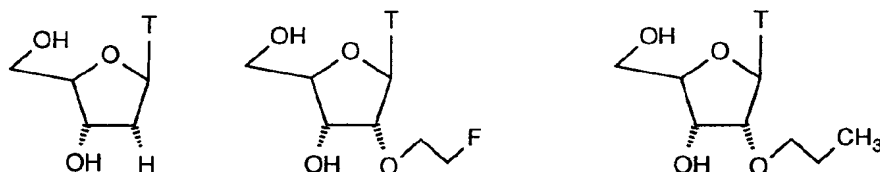
sind in der Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Spezifität

sense: 3'-GAG CAU GGY AAG GCC AGG-5' (RNA)

anti: 5'-CTC GTA CCT TTC CGG TCC-3' (DNA)

$T_m(^{\circ}\text{C})$ resp. ΔT_m

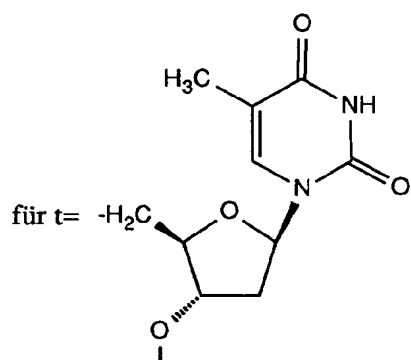
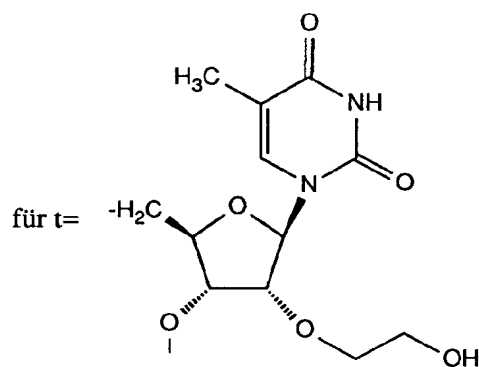
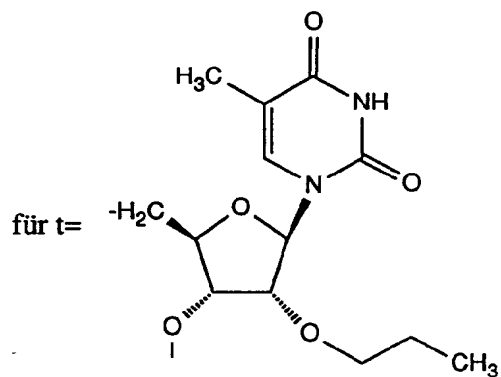
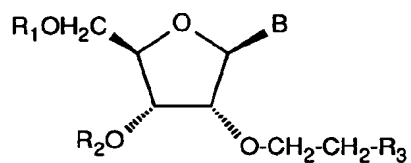


Y=A	63,3	65,0	69,4
Y=C	54,5	55,5	55,8
	(- 8,9)	(- 9,5)	(- 8,6)
Y=G	61,6	59,7	60,5
	(- 1,7)	(- 5,3)	(- 4,0)
Y=U	55,8	56,2	56,8
	(- 7,5)	(- 8,8)	(- 7,7)
Y=none	59,4	56,1	57,4
	(- 3,9)	(- 8,9)	(- 7,0)

Beispiel C3:

Nucleasestabilität; Enzymatische Hydrolyse verschiedener Oligonukleotide der Sequenz d(TCC AGG TGT CCG ttt C)

Je 14 μg des synthetischen Oligonukleotids beziehungsweise des entsprechenden natürlichen Oligomers werden in 200 μl 10%-igem Hitze-inaktivierten Serum aus Kalbsföten bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert ($c = 70 \mu\text{g/ml}$). Nach 0,5; 1; 2; 4; 6; 24 und 48 Stunden werden jeweils 15 μl der Reaktionslösung durch Zugabe zu 25 μl 9 M Harnstoff und Trisborat-Puffer (pH 7) gequencht und bis zur Messung bei -20 $^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die gequenchten Reaktionslösungen werden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Spaltprodukte über den Phosphorgehalt bestimmt (Phospho-imagers-Methode). Das Verhältnis R der Summe der Konzentrationen des völlig intakten Oligonukleotids ($c_n^{(t)}$) und des durch Abspaltung des natürlichen C-Bausteins vom 3'-Ende entstehenden Fragments ($c_{n-1}^{(t)}$) zu einer gegebenen Zeit t zur Ausgangskonzentration des völlig intakten Oligonukleotids zum Zeitpunkt t = 0 ($c_n^{(0)}$) $R = (c_n^{(t)} + c_{n-1}^{(t)})/c_n^{(0)}$ wird gegen die Zeit graphisch aufgetragen. Die dabei ermittelten Halbwertszeiten $\tau_{1/2}$ - das sind jene Zeiten, für die $R=0,5$ - betragen

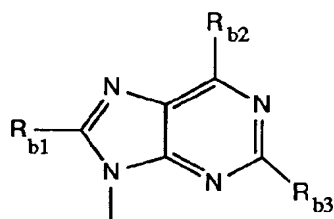
 $\tau_{1/2} = 1,7 \text{ h,}$  $\tau_{1/2} = 40 \text{ h}$  $\tau_{1/2} = 10 \text{ h.}$ **Patentansprüche****1. Verbindungen der Formel I**

(I)

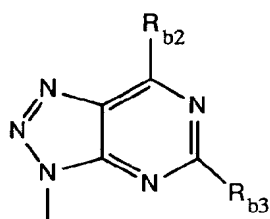
worin R₁ und R₂ unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder R₁ diese Bedeutungen hat und R₂ für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und R₃ für OH, F oder (CF₂)_nCF₃

steht, worin n eine Zahl von 0 bis 7 bedeutet.

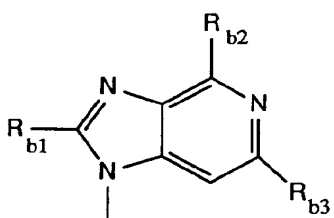
2. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R_1 und R_2 je für Wasserstoff stehen.
3. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R_1 und R_2 gleiche Schutzgruppen bedeuten.
4. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin B als Purinrest oder einem Analogen davon einen Rest der Formel II, IIa, IIb, IIc, IId, IIe oder IIf darstellt,



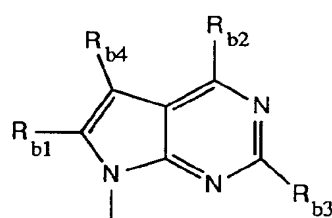
(II),



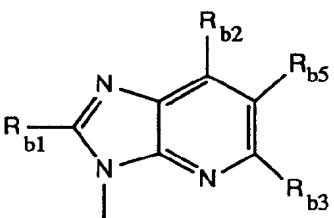
(IIa),



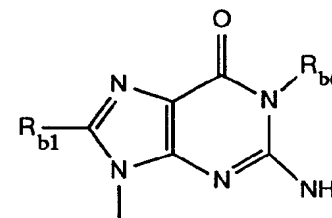
(IIb),



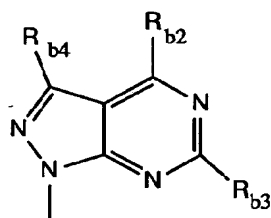
(IIc),



(IId),



(IIe),



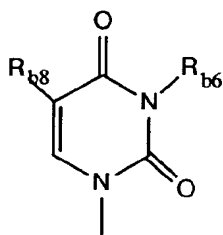
(IIf),

worin R_{b1} für H, Cl, Br, OH oder $-O-C_1-C_{12}$ -Alkyl steht, und R_{b2} , R_{b3} und R_{b5} unabhängig voneinander H, OH, SH, NH_2 , $NHNH_2$, $NHOH$, $NHO-C_1-C_{12}$ -Alkyl, $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$, $-N=CH$ -Azacycloalkyl, F, Cl, Br, C_1-C_{12} -Alkyl, Hydroxy- C_1-C_{12} -alkyl, Amino- C_1-C_{12} -alkyl, C_1-C_{12} -Alkoxy, Benzyloxy, C_1-C_{12} -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen oder Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen bedeuten, R_{b4} Wasserstoff, CN oder $-C\equiv C-R_{b7}$ sowie R_{b6} und R_{b7} Wasserstoff oder C_1-C_4 -Alkyl darstellen.

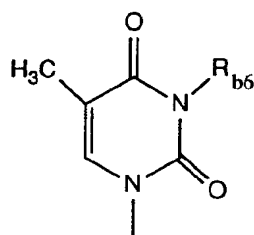
5. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin die Schutzgruppe für Hydroxyl- und Aminogruppen C_1-C_8 -Acyl darstellt.
6. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin das Primäramino 1 bis 12 C-Atome und das Sekundäramino 2

bis 12 C-Atome enthält.

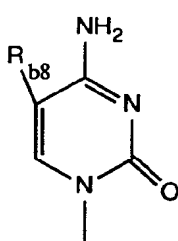
7. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin es sich bei dem Primäramino und Sekundäramino um Reste der Formel $R_{a1}R_{a2}N$ handelt, worin R_{a1} für H steht oder unabhängig die Bedeutung von R_{a2} hat, und R_{a2} C₁-C₂₀-Alkyl, -Aminoalkyl, -Hydroxyalkyl; Carboxyalkyl oder Carbalkoxyalkyl, wobei die Carbalkoxygruppe 2 bis 8 C-Atome enthält und die Alkylgruppe 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 C-Atome; C₂-C₂₀-Alkenyl; Phenyl, Mono- oder Di-(C₁-C₄-Alkyl- oder Alkoxy)phenyl, Benzyl, Mono- oder Di-(C₁-C₄-Alkyl- oder -Alkoxy)benzyl; oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolyl-C₁-C₆-Alkyl darstellt, oder R_{a1} und R_{a2} zusammen Tetra- oder Pentamethylen, 3-Oxa-1,5-pentyl, -CH₂-NR_{a3}-CH₂CH₂- oder -CH₂CH₂-NR_{a3}-CH₂CH₂- darstellen, worin R_{a3} für H oder C₁-C₄-Alkyl steht, wobei die Aminogruppe im Aminoalkyl unsubstituiert oder mit ein oder zwei C₁-C₄-Alkyl oder -Hydroxyalkylgruppen substituiert ist, und die Hydroxylgruppe im Hydroxyalkyl gegebenenfalls mit C₁-C₄-Alkyl verethert ist.
8. Verbindungen gemäss Anspruch 6, worin es sich bei dem Primäramino und Sekundäramino um Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethyl-, Allyl-, Mono- oder Di-(hydroxyeth-2-yl)-, Phenyl- und Benzyl-, Acetyl-, Isobutyryl und Benzoylamino handelt.
9. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin R_{b1} in den Formeln II, IIb, IIc, IId und IIe für Wasserstoff steht.
10. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin R_{b5} in Formel IId für Wasserstoff steht.
11. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin R_{b2} und R_{b3} in den Formeln II, IIa, IIb, IIc, IId und IIf unabhängig voneinander H, F, Cl, Br, OH, SH, NH₂, NHOH, NHNH₂, Methylamino, Dimethylamino, Benzoylamino, Methoxy, Ethoxy und Methylthio darstellen.
12. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin B ein Purinrest oder ein Rest eines Purinanalogen aus der Reihe Adenin, N-Methyladenin, N-Benzoyladenin, 2-Methylthioadenin, 2-Aminoadenin, 6-Hydroxypurin, 2-Amino-6-chlorpurin, 2-Amino-6-methylthiopurin, Guanin und N-Isobutyrylguanin ist.
13. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin B in Formel I als Pyrimidinrest einen Uracil-, Thymin- oder Cytosinrest der Formel III, IIIa, IIIb oder IIIc darstellt,



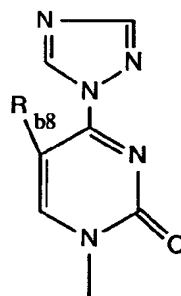
(III),



(IIIa)



(IIIb),

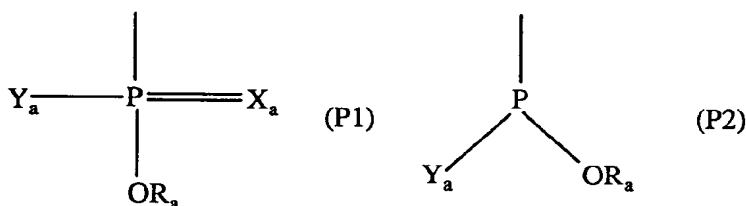


(IIIc)

- worin R_{b6} H oder C₁-C₄-Alkyl und R_{b8} H, OH, SH, NH₂, NHNH₂, NHOH, NHO-C₁-C₁₂-Alkyl, -N=CH-N(C₁-C₁₂-Alkyl)₂, -N=CH-Azacycloalkyl, F, Cl, Br, C₁-C₁₂-Alkyl, Hydroxy-C₁-C₁₂-alkyl, Amino-C₁-C₁₂-alkyl, C₁-C₁₂-Alkoxy, Benzyloxy, C₁-C₁₂-Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen,

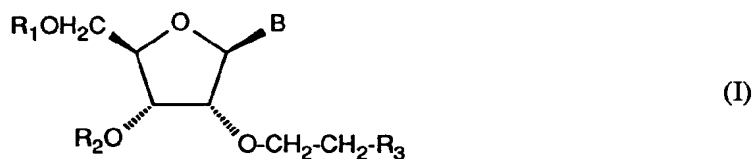
Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen, C₁-C₁₂-Alkenyl oder C₁-C₁₂-Alkynyl bedeuten, und die NH₂-Gruppe in Formel IIIb unsubstituiert oder mit C₁-C₆-Alkyl, Benzoyl oder einer Schutzgruppe substituiert ist, sowie die Dihydroderivate der Reste der Formeln III, IIIa, IIIb und IIIc.

- 5 14. Verbindungen gemäss Anspruch 13, worin R_{b8} H, C₁-C₆-Alkyl oder -Hydroxyalkyl, C₂-C₆-Alkenyl oder -Alkynyl, F, Cl, Br, NH₂, Benzoylamino, Mono- oder Di-C₁-C₆-alkylamino darstellt.
15. Verbindungen gemäss Anspruch 13, worin R_{b8} H, C₁-C₆-Alkyl oder -Alkoxy oder -Hydroxyalkyl, C₂-C₆-Alkenyl oder Alkynyl, F, Cl, Br, NH₂, Benzoylamino, Mono- oder Di-C₁-C₆-alkylamino darstellt.
- 10 16. Verbindungen gemäss Anspruch 14, worin R_{b8} H, F, Cl, Br, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, C₁-C₄-Alkyl, C₂-C₄-Alkenyl-(1) oder C₂-C₄-Alkynyl-(1) bedeutet.
17. Verbindungen gemäss Anspruch 15, worin R_{b8} H, C₁-C₄-Alkyl, C₂-C₄-Alkenyl-(1), C₂-C₄-Alkynyl-(1), NH₂, NHCH₃ oder (CH₃)₂N bedeutet.
- 15 18. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin B als Rest eines Pyrimidinanalogen sich von Uracil, Thymin, Cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Chloruracil, 5-Bromuracil, Dihydrouracil, 5-Methylcytosin, 5-Propinthymin und 5-Propincytosin ableitet.
- 20 19. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R₂ als phosphorhaltiger eine Nukleotid-Brückengruppe bildender Rest der Formel P1 oder P2

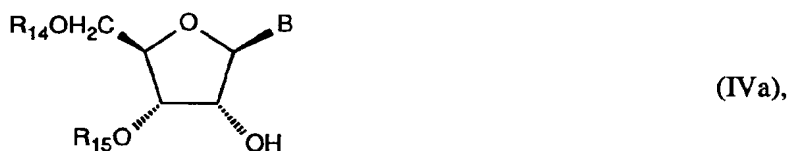


entspricht, worin Y_a Wasserstoff, C₁-C₁₂-Alkyl, C₆-C₁₂-Aryl, C₇-C₂₀-Aralkyl, C₇-C₂₀-Alkaryl, -OR_b, SR_b, -NH₂, Primäramino, Sekundäramino, O[⊖]M[⊕] oder S[⊖]M[⊕] darstellt; X_a Sauerstoff oder Schwefel bedeutet; R_a Wasserstoff, C₁-C₁₂-Alkyl, C₂-C₁₂-Alkenyl, C₆-C₁₂-Aryl, oder die Gruppe R_aO- für N-Heteroaryl-N-yl mit 5 Ringgliedern und 1 bis 3 N-Atomen steht; R_b Wasserstoff, C₁-C₁₂-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl bedeutet; und M[⊕] für Na[⊕], K[⊕], Li[⊕], NH₄[⊕] steht oder Primär-, Sekundär-, Tertiär- oder Quaternärammonium darstellt; wobei Alkyl, Aryl, Aralkyl und Alkaryl in Y_a, R_a und R_b unsubstituiert oder mit Alkoxy, Alkylthio, Halogen, -CN, -NO₂, Phenyl, Nitrophenyl, oder Halogenphenyl substituiert ist.

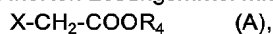
- 40 20. Verbindungen gemäss Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass R_a β-Cyanoethyl bedeutet, und Y_a Di(i-propyl)amino darstellt.
21. Verbindung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R₃ OH bedeutet.
- 45 22. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R₃ F bedeutet.
23. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R₃ (CF₂)_nCF₃ und n eine Zahl von 0 bis 7 bedeutet.
- 50 24. Verbindungen gemäss Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass n die Zahl 0 bedeutet.
25. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I,



worin R_1 und R_2 unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen;
 B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und
 (a) R_3 OH bedeutet,
 dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel IVa

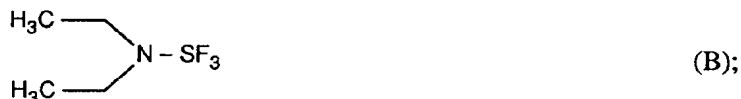


worin R_{14} und R_{15} für gleiche oder verschiedene Schutzgruppen stehen und B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet, wobei funktionelle Gruppen im Basenrest B durch Schutzgruppen geschützt sind, in einem inerten Lösungsmittel mit einer Verbindung der Formel A umgesetzt

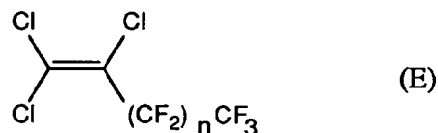
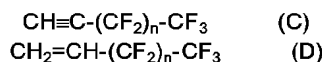


worin R_4 C_1 - C_4 -Alkyl und X Cl, Br, I, Tosyl-O oder Mesyl-O bedeutet;
 und die Esterfunktion anschliessend mit NaBH_4 oder LiAlH_4 reduziert, wobei die entstehende OH-Gruppe vorübergehend mit einer Gruppe wie für R_1 definiert geschützt werden kann;

(b) R_3 F bedeutet,
 dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel I, worin R_3 OH bedeutet, mit einer Verbindung der Formel B umgesetzt



(c) R_3 $-(\text{CF}_2)_n\text{-CF}_3$ bedeutet, worin n für eine Zahl von 0 bis 7 steht,
 dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel IVa mit einer Verbindung der Formel C, D oder E umgesetzt



und anschliessend die gegebenenfalls vorhandene Doppelbindung oder chlorierte Doppelbindung katalytisch zu $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_n\text{CF}_3$ reduziert;

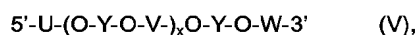
(d) R_3 OH, F oder $-(\text{CF}_2)_n\text{-CF}_3$ bedeutet, worin n für eine Zahl von 0 bis 7 steht,
 dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel IVb



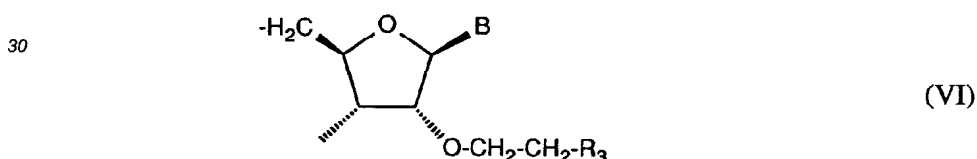
worin R_{14} und R_{15} die oben erwähnte Bedeutung haben und A für eine Abgangsgruppe steht, nach einem der in (a) bis (c) beschriebenen Verfahren an der 2'-OH Gruppe substituiert und den Basenrest B durch Substitution einführt; und gegebenenfalls die Schutzgruppen R_{14} und R_{15} abspaltet.

- 5 26. Verwendung der Verbindungen gemäss Anspruch 1 zur Herstellung von Oligonukleotiden, die gleiche oder verschiedene Monomereinheiten von Verbindungen der Formeln I oder die mindestens eine Monomereinheit von Verbindungen der Formeln I in Kombination mit Monomereinheiten von anderen natürlichen oder synthetischen Nukleosiden enthalten, wobei die Oligonukleotide aus 2 bis 200 Monomereinheiten bestehen.
- 10 27. Verwendung gemäss Anspruch 26 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit 2 bis 100 Monomereinheiten.
28. Verwendung gemäss Anspruch 27 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit 2 bis 50 Monomereinheiten.
- 15 29. Verwendung gemäss Anspruch 28 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit 4 bis 30 Monomereinheiten.
30. Verwendung gemäss Anspruch 26 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit gleichen oder verschiedenen Monomereinheiten von Verbindungen der Formeln I.
- 20 31. Verwendung gemäss Anspruch 26 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit gleichen Monomereinheiten von Verbindungen der Formeln I und Monomereinheiten von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden.

32. Oligonukleotide der Formel V



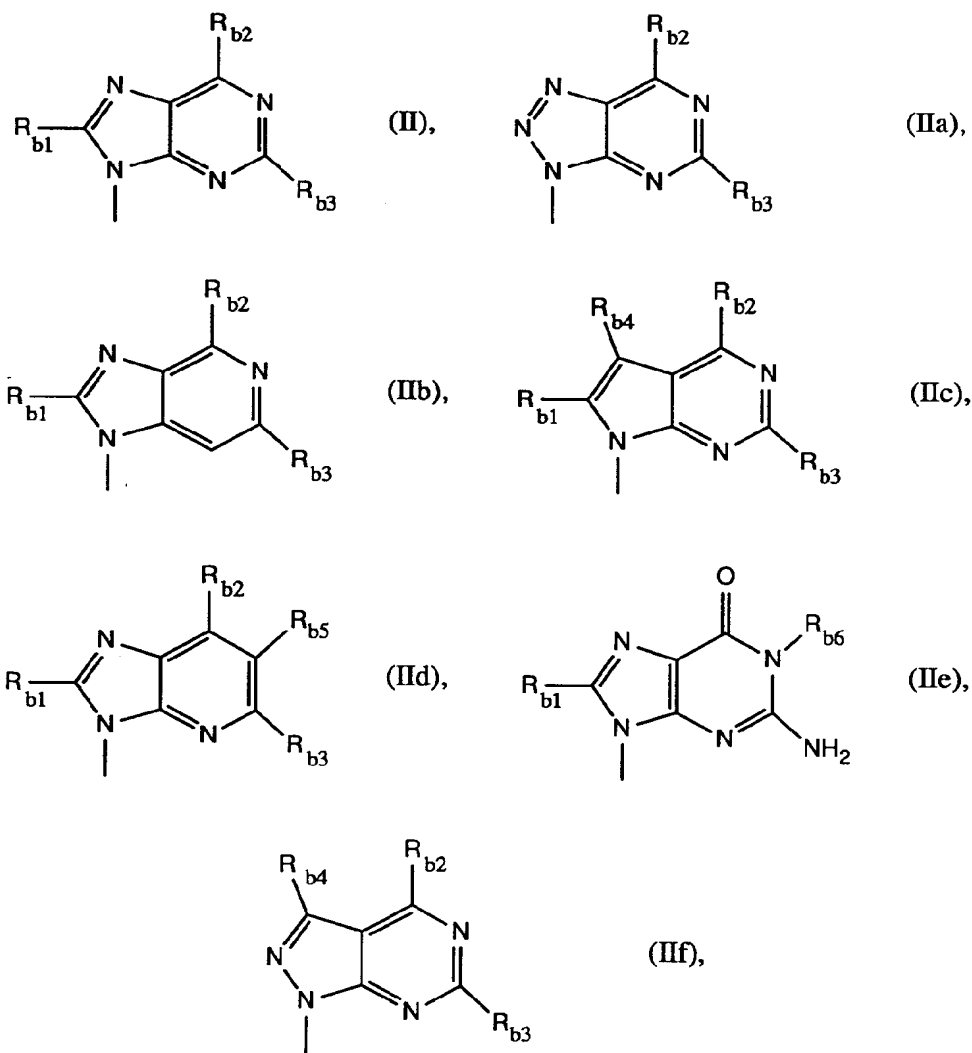
- 25 worin x eine Zahl von 0 bis 200 und Y eine Nukleotid-Brückengruppe bedeuten; U, V und W je für sich gleiche oder verschiedene Reste von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden darstellen und mindestens einer der Reste U, V und/oder W einen Rest der Formel VI bedeutet



- 35 worin B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon darstellt; und R_3 für OH, F oder $(CF_2)_nCF_3$ steht, worin n eine Zahl von 0 bis 7 bedeutet.

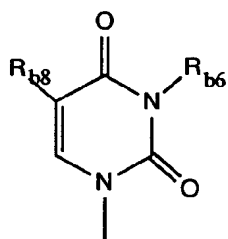
33. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass n die Zahl 0 bedeutet.
- 40 34. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Brückengruppe Y um $-P(O)O^{\ominus}-$, $-P(O)S^{\ominus}-$, $-P(S)S^{\ominus}-$, $-P(O)R_{16}-$, $-P(O)NR_{17}R_{18}-$, oder $-CH_2-$ handelt, worin R_{16} H oder C_1-C_6 -Alkyl darstellt, und R_{17} und R_{18} unabhängig voneinander die Bedeutung von R_{16} haben.
- 45 35. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass sich bei der Brückengruppe Y um $-P(O)O^{\ominus}-$ handelt.
36. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass x für eine Zahl von 0 bis 100 steht.
- 50 37. Oligonukleotide gemäss Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass x für eine Zahl von 1 bis 50 steht.
38. Oligonukleotide gemäss Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass x für eine Zahl von 3 bis 29 steht.
39. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Reste der Formel VI endständig und/oder in der Nukleotidsequenz gebunden sind.
- 55 40. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Reste der Formel VI zwischen Resten von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden gebunden sind.

41. Oligonukleotide gemäss den Ansprüchen 39 und 40, dadurch gekennzeichnet, dass 2 bis 5 gleiche oder verschiedene Reste der Formel VI aufeinander folgen.
42. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass insgesamt 4 bis 30 Nukleosideinheiten und 1 bis 12 Reste der Formel VI enthalten sind.
43. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, worin B als Purinrest oder einem Analogen davon einen Rest der Formeln II, IIa, IIb, IIc, IId, IIe oder IIIf darstellt,

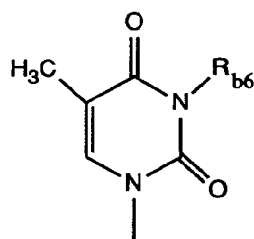


worin R_{b1} für H, Cl, Br, OH oder -O-C₁-C₁₂-Alkyl steht, und R_{b2}, R_{b3} und R_{b5} unabhängig voneinander H, OH, SH, NH₂, NHHN₂, NHOH, NHO-C₁-C₁₂-Alkyl, -N=CH-N(C₁-C₁₂-Alkyl)₂, -N=CH-N-Cycloalkyl, F, Cl, Br, C₁-C₁₂-Alkyl, Hydroxy-C₁-C₁₂-alkyl, Amino-C₁-C₁₂-alkyl, C₁-C₁₂-Alkoxy, Benzyloxy, C₁-C₁₂-Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen oder Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen bedeuten, R_{b4} Wasserstoff, CN oder -C≡C-R_{b7}, R_{b6} und R_{b7} Wasserstoff oder C₁-C₄-Alkyl darstellen.

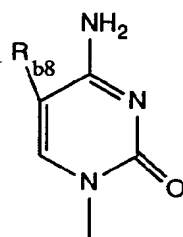
44. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, worin B einen Uracil-, Thymin- oder Cytosinrest der Formel III, IIIa, IIIb oder IIIc darstellt,



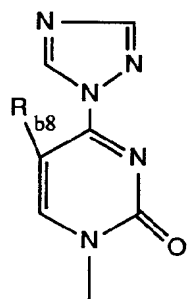
(III),



(IIIa)



(IIIb),



(IIIc)

worin R_{b6} H oder C_1 - C_4 -Alkyl und R_{b8} H, OH, SH, NH_2 , $NHNH_2$, $NHOH$, NHO - C_1 - C_{12} -Alkyl, $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$, $-N=CH-N$ -Cycloalkyl, F, Cl, Br, C_1 - C_{12} -Alkyl, Hydroxy- C_1 - C_{12} -alkyl, Amino- C_1 - C_{12} -alkyl, C_1 - C_{12} -Alkoxy, Benzyloxy, C_1 - C_{12} -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen, Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen, C_1 - C_{12} -Alkenyl oder C_1 - C_{12} -Alkynyl bedeuten, und die NH_2 -Gruppe in Formel IIIb unsubstituiert oder mit C_1 - C_6 -Alkyl, Benzoyl oder einer Schutzgruppe substituiert ist, sowie die Dihydroderivate der Reste der Formeln III, IIIa, IIIb und IIIc.

45. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, worin R_3 OH bedeutet.
46. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, worin R_3 F bedeutet.
47. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, worin R_3 $(CF_2)_nCF_3$ bedeutet.
48. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, worin n eine Zahl von 0 bis 3 bedeutet.
49. Oligonukleotide gemäss Anspruch 48, worin n 0 bedeutet.
50. Verwendung der Oligonukleotide der Formel V als Diagnostika zum Nachweis von viralen Infektionen oder genetisch bedingten Krankheiten.
51. Oligonukleotide der Formel V zur Anwendung in einem therapeutischen Verfahren zur Behandlung von Krankheiten bei Warmblütern einschliesslich des Menschen durch Wechselwirkung mit Nukleotidsequenzen im Körper.
52. Pharmazeutisches Präparat, enthaltend eine wirksame Menge eines Nukleosids der Formeln I oder eines Oligonukleotids der Formel V alleine oder zusammen mit anderen Wirkstoffen, ein pharmazeutisches Trägermaterial und gegebenenfalls Hilfsstoffe.